Ueber die thermische Desaggregierung von Proteinen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

genehmigt von der Philosophischen Fakultät

der Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin

von

Hans Pollak

aus Hamburg.

Tag der mündlichen Prüfung: 12. 5. 1932.

Tag der Promotion: 13. 12. 1933.

Spezialdruckerei für Dissertationen Dr. Hermann Eschenhagen, KG., Ohlau i. Sch.

128

Referenten:

Prof. Dr. W. Schlenk

Prof. Dr. M. Bodenstein

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Meiner verehrungswürdigen
Mutter in Dankbarkeit
gewidmet

Inhaltsverzeichnis.

Seite

A. Theoretischer Teil.

I. Ueber die Konstitution der Proteine unter besonderer Berücksichtigung der in dieser Arbeit untersuchten Stoffe.

1. Allgemeine Betrachtungen zur Chemie der Eiweißkörper. 1
2. Kollagen und Glutin. 4
3. Desaggregierung von Gelatine. 6

II. Problemstellung und Zielsetzung. 7

B. Experimenteller Teil.

I. Das Ausgangsmaterial:

1. Proteine:
   a) Gelatine 9
   b) Eialbumin 10
   c) Casein 10
2. Synthetisch gewonnene Peptide:
   a) Leucylglycin 11
   b) Triglycyl-glycin 12

II. Angewandte Methoden zur Ermittlung des chemischen Abbaues von Eiweißkörpern:

1. Alkalimetrische Bestimmung von Aminosäuren und Polypeptiden: 13
2. Messung des Aminosäure-Stickstoffs nach van Slyke 13

III. Die durchgeführten Versuche:

A) Quantitative Untersuchungen bezüglich des Abbaues

1. Hitzebehandlung einer 25%igen Gelatinelösung
   a) bei einer Temperatur von 75°
      α) bei einem p_h von 6,85 16
      β) bei einem p_h von 6,1 18
      γ) bei einem p_h von 7,94 20
      δ) bei einem p_h von 8,3 22
      ε) bei einem p_h von 5,00 24
   b) bei 50° und p_h 4,3 27

Seite

2. Hitzebehandlung einer 9%igen Ovalbuminlösung bei 50° und p_h 6,9 29
3. Hitzebehandlung einer 15%igen Caseinlösung bei 50° und p_h 6,74 31
4. Hitzebehandlung einer 0,13 n-Leucylglycinlösung bei 100°
   a) bei einem p_h von 6,93 33
   b) bei einem p_h von 5,33 35
5. Hitzebehandlung einer n/20-Lösung von Triglycylglycin bei 100°
   a) bei einem p_h von 6,95 36
   b) bei einem p_h von 5,39 37

B) Qualitative Untersuchungen

1. Fluoreszenzerscheinungen im filtrierten Ultraviolettlicht
   a) an unvorbehandeltem und an desaggregiertem Eialbumin 39
   b) an unvorbehandelter und an desaggregierter Caseinlösung 41
2. Reaggregierung von Gelatine 42
3. Gerbfähigkeit von intakter und von desaggregierter Gelatine 43
4. Extraktion von Gelatinedesaggregat mit Essigester 45

C. Zusammenfassung und Ergebnisse. . . 49

A. Theoretischer Teil.

I. Ueber die Konstitution der Proteine unter besonderer Berücksichtigung der in dieser Arbeit untersuchten Stoffe:

1. Allgemeine Betrachtungen zur Chemie der Eiweißkörper.

Es ist allgemein bekannt, daß die chemische Forschung seit mehr denn einem Jahrhundert sich mit steigender Intensität dem Problem der Klärung der Konstitution der insbesondere in biologischer Hinsicht so wichtigen Proteine widmet. Es ist ihr dabei möglich gewesen, unwiderlegbar den Nachweis dafür zu erbringen, daß die Eiweißstoffe zur Hauptsache aus α-Aminosäuren aufgebaut sind. Wie jedoch in den äußerst hochmolekularen Eiweißkörpern die einzelnen Bauelemente unter einander verknüpft sind, ist noch immer nicht restlos aufgeklärt.

Der von F. Hofmeister[1]) und E. Fischer[2]) begründeten und weitgehend experimentell gestützten Hypothese, der zufolge lange Aminosäureketten anzunehmen sind, wurde widersprochen. E. Fischer hatte das Molekulargewicht der Eiweißstoffe in der Größenordnung von 4—5000 geschätzt[3]). Mit Rücksicht auf Molekulargewichtsbestimmungen in Phenol, aus denen beispielsweise für Gelatine ein Molekulargewicht von etwa 350 hervorging[4]), ferner unter Berücksichtigung röntgenoptischer Studien folgerte man aber später, daß kleine Struktureinheiten vorhanden wären, die durch aggregierende Kräfte zusammengeschlossen sein sollten[5]).

---

[1]) F. Hofmeister, Ztschr. physiol. Chem. 2.; 299 (1878).
[2]) E. Fischer, Ber. Dtsch. chem. Ges. 39; 530 (1906).
[3]) ders., Ztschr. physiol. Chem. 99; 54 (1917).
[4]) N. Troensegaard & J. Schmidt, ebenda, 113; 116 (1924).
[5]) R. O. Herzog, Naturwiss. 11; 179 (1923).

Kritische Diskussionen bezüglich der Auswertung der röntgenographischen Befunde, der in Kresol und Phenol vorgenommenen Molekulargewichtsbestimmungen und insbesondere Fermentstudien machten diese Aggregierungshypothese kleiner Strukturelemente sehr unwahrscheinlich.

Die Ueberwindung dieser Theorie brachten vor allem die Untersuchungen von K. H. Meyer und Mark, aus denen hervorging, daß bei Kautschuk, Cellulose und Eiweißstoffen in großen Zügen ein ähnlicher Aufbau anzunehmen sei[6]). Danach sind in diesen „hochpolymeren“[7]) Naturstoffen lange Hauptvalenzketten untereinander zum Kristallit gefügt und verdanken ihren Zusammenhalt der Assoziation durch Mizellarkräfte. Es sind immer viele Elementarkörper (Primärteilchen) zu einem Mizell vereinigt. Die Assoziation ist als ein Zusammenschluß von Molekülen aufzufassen, der durch die Betätigung von Nebenvalenzen hervorgerufen wird. Ein geeigneter Maßstab für den Umfang solcher Assoziationen bietet sich in der Molkohäsion dar. Aus der sicher festgestellten Additivität der Molkohäsion ist zu folgern, daß kleine Strukturmolekeln nie als Bausteine hochpolymerer Verbindungen in Betracht zu ziehen sind. Die Hauptvalenzketten bilden auch im gelösten Zustande unter normalen, gelinden Bedingungen Mizelle[8]). Vielleicht ist auch eine Vernetzung der Hauptvalenzketten derart anzunehmen, daß die Ketten untereinander an einzelnen Punkten nicht durch Nebenvalenzen, sondern durch Hauptvalenzen verfestigt sind. Schon vorher hatte E. Stiasny[9]) im Kollagen eine durch lockere Bindungen bewirkte „Aggregation“ von Polypeptidketten zu größeren Gebilden als möglich erachtet. Auch die kürzlich erfolgte Feststellung Abderhaldens[10]), daß bei aus Glykokoll aufgebauten Polypeptiden die höheren Glieder beständige Hydrosole bilden, könnte als eine Stütze für die Molkohäsion angeführt werden.

---

[6]) K. H. Meyer, Ztschr. f. angew. Chem. 41; 935 (1928).

[7]) Der Ausdruck „hochpolymer“ dürfte vielleich nicht glücklich sein.

[8]) K. H. Meyer & H. Mark, „Der Aufbau der hochpolymeren organischen Naturstoffe“; S. 227, Leipzig 1930.

[9]) E. Stiasny, Collegium 1920; S. 255.

[10]) E. Abderhalden & J. Heumann, Ber. d. Dtsch. chem. Ges. S. 1945 (1930).

In Uebereinstimmung hiermit in wesentlichen Punkten befindet sich S. P. L. Sörensen[11]), wenn er die Proteine als reversibel dissoziable Komponentensysteme auffaßt. Er nimmt eine reversible Verknüpfung der verschiedenen Komponenten durch Restvalenzen an. Aenderungen in der Zusammensetzung der Lösung vermögen eine reversible Dissoziation des gerade bestehenden Komponentensystems auszulösen. Werden durch derartige Aenderungen ausreichende Quantitäten eines unter den neuen Bedingungen schwerlöslichen Komponentensystems gebildet, so erfolgt Abscheidung dieses Systems.

Die Dissoziationstendenz von Ovalbumin beispielsweise ist gering, diejenige des Caseins war unter den von Sörensen gewählten Versuchsbedingungen recht bedeutend.

Mittels Zentrifugen konnte nun The Svedberg die Sedimentierungsgeschwindigkeit löslicher Proteine ermitteln und daraus Molekulargewicht und Molekülgröße einiger Eiweißstoffe herleiten. Z. B. ergab sich für Eialbumin ein Molekulargewicht von etwa 35 000[12]) und für dessen Moleküle eine kugelförmige Gestalt. Das Hammarsten-Casein[13]) erwies sich als ein aus Eiweißmolekülen ungleicher Größe bestehendes Gemisch. Merkwürdig ist, daß das Molekulargewicht anderer Proteine ein Vielfaches von 35 000 beträgt. Das Eialbumin könnte daher als chemische Einheit aufgefaßt werden, die reversibel nicht aufteilbar wäre.

Man schloß nun[14]) auf Grund der Röntgenspektrographien, vor allem von Seide, auf einen kristallinen Bestandteil, der in einer amorphen Kittsubstanz gleicher Zusammensetzung eingebettet wäre. O. Gerngroß und K. Herrmann[15]) gelangten zu einer Auffassung, die im Einklang mit den Anschauungen von Meyer, Mark und Sörensen ist. Sie vermuten einen viel innigeren Zusammenhang zwischen den

---

[11]) S. P. L. Sörensen, Colloid-Ztschr. 53; Heft 1—3 (1930).

[12]) The Svedberg & I. B. Nichols, Journ. Amer. Chem. Soc. 48; 3081 (1926).

[13]) ders., L. M. Carpenter & D. C. Carpenter, ebend. 52; 241 (1930).

[14]) R. O. Herzog, Ztschr. angew. Chem. 39; 300 (1926).

[15]) W. Abitz, O. Gerngross & K. Herrmann, Naturwissenschaften 18; 754 (1930).

K. Herrmann, O. Gerngross & W. Abitz, Ztschr. f. physik. Chem., Abt. B; 10, 371 (1930).

beiden Bestandteilen der Gelatine. Sie meinen, daß die den „amorphen" Bestandteil der Gelatine darstellenden Polypeptidketten an den Enden der Kristallite nur wenige, am Schluß jedoch gar keine Querverbindungen mehr besitzen und in unorientierten Fransen über die Enden der Kristallite hinausragen. Die durch die Kraftfelder der gleichsinnige Ladungen tragenden Aminoendgruppen auf der einen und der Carboxylendgruppen auf der anderen Seite hervorgerufene elektrostatische Abstoßung der Enden der Hauptvalenzketten von einander macht es verständlich, daß an den Polypeptidkettenenden die Neigung, Querverbindungen einzugehen, vermindert erscheint. Die fadenförmigen Fransen bewirken sodann mittels Partialvalenzen und heteropolarer Gruppen die gegenseitige Verknüpfung der Mizelle.

Möglicherweise ist in dem mit vielen Tatsachen der Erfahrung in Uebereinstimmung befindlichen Bild des Fransenmizells ein Bauelement allgemeinerer Natur zu erblicken.

2. Kollagen und Glutin.

Einen hervorragenden Platz darf, bezüglich der Klärung des Problems des mizellaren Baues der Proteine, die Frage nach den genetischen Beziehungen zwischen Kollagen und Glutin für sich in Anspruch nehmen[16]).

Anfangs[17]) nahm man an, daß Glutin und dessen Stammsubstanz, das Kollagen, als Isomere oder Polymere anzusprechen wären. Jedoch vermutete E. Stiasny[18]), daß die Verwandlung des Kollagens in Gelatine in einer Lösung von Partialvalenzen bestehen müßte. Hieraus müßte der Schluß gezogen werden, daß Kollagen und Glutin den gleichen chemischen Molekülaufbau besitzen; hierfür könnte ihr gleiches Säurebindungsvermögen[19]), zumal bei Anwesenheit von Formaldehyd[20]), sprechen.

Dagegen ließ sich allerdings zunächst die Verschiedenheit der Röntgendiagramme ins Feld führen. So ergaben die

---

[16]) O. Gerngross, Ztschr. f. angew. Chem. 38; 85 (1925).
[17]) L. Gmelin, Hdb. d. organ. Chem. V, 483; Heidelberg 1858.
[18]) E. Stiasny, Collegium, 1920; S. 255.
[19]) H. R. Procter, Coll.-chem. Beihefte 2; 259 (1911); V. Kubelka, Collegium 1918; S. 364.
[20]) A. Hloch, Dissertation Technische Hochschule Berlin 1926.

Versuche Sherrers für die Gelatine einen amorphen Aufbau, während Sehnenkollagen Kristallinterferenzen aufwies. Erst Gerngroß und Katz zeigten, daß gedehnte Gelatine weitgehende Uebereinstimmung mit dem Röntgendiagramm einer tierischen Sehne ergibt[21]). So gewann die Vorstellung, daß Glutin und Kollagen aus den nämlichen langgestreckten Kristalliten beständen, erheblich an Bedeutung.

Heutzutage stellt man sich den Umwandlungprozeß so vor, daß das Kollagen während des Ausschmelzens — vorwiegend durch Desaggregierung — in Teilchen geringerer Molekulargröße, das Glutin, zerfällt. Neben der erwähnten Analogie des Säurebindungsvermögens und der Röntgenspektrographie beider Stoffe darf auch die Uebereinstimmung der isoelektrischen Punkte von Hautkollagen und von Hautgelatine[22]) als wichtige Stütze für diese Auffassungsweise nicht übersehen werden.

Man muß sich wohl die Umwandlung von Kollagen in Glutin so denken, daß die hochgequollen Kollagenfasermassen beim Erhitzen auf 40 bis 50° in Glutinmizellen zerfallen. Erfolgt das Ausschmelzen bei zu hoher Temperatur und bei extremen Wasserstoffionenkonzentrationen, so tritt bekanntlich keine Desaggregierung, sondern eine Hydrolyse ein.

Allerdings darf man sich nicht verhehlen, daß die Annahme der Identität der Mizelle des Kollagens und des Glutins insbesondere mit der Differenz ihrer mechanischen Festigkeit nicht ganz in Einklang zu bringen ist. Es wird daher ins Auge zu fassen sein, daß das Kollagen zum Unterschied von der Gelatine doch vereinzelt festigende, netzartige Bindungen, mithin hauptvalenzchemische Querverbindungen, zwischen den Polypeptidketten besitzt. Diese Vernetzung würde dann beim Quellvorgang, der dem Ausschmelzprozeß stets voranzugehen hat, zertrümmert werden[23]). Sie muß im Röntgenbilde in Erscheinung treten[24]).

---

[21]) O. Gerngross und J. R. Katz, Colloid-Zeitschrift 39; 181 (1926).

[22]) O. Gerngroß & St. Bach, Biochem. Ztschr. 143; 543 (1923).

[23]) K. H. Meyer & H. Mark, „Aufbau der hochpolymeren organischen Naturstoffe"; S. 227, Leipzig 1933.

[24]) O. Gerngross & P. Köppe, Ztschr. f. angew. Chem. 44; 983 (1931).

3. Desaggregierung von Gelatine.

Beim Erhitzen einer Gelatinelösung gibt sich bekantlich ein Rückgang ihrer physikalischen Qualitäten zu erkennen. Man nahm allgemein Hydrolyse an. Nun stellten zum ersten Male O. Gerngroß und H. Brecht[25]) fest, daß, wenn die Erhitzung in der Nähe des isoelektrischen Punktes vorgenommen wird, das Absinken der Viskosität, Gallertfestigkeit und Klebkraft von einem nur minimalen hydrolytischen Abbau begleitet ist. Es konnte mithin nur eine physikalisch bedingte Verkleinerung des Ballungszustandes — eine Desaggregierung — eingetreten sein.

Wohl ruft die Thermolyse bei isoelektrischer Reaktion schon nach 7½stündigem Erhitzen auf 100° eine leichte Farbvertiefung, nach mehrtägiger Hitzebehandlung einen auf eine chemische Veränderung hinweisenden schwachen Fleischextraktgeruch und nach vierzehntägiger Erwärmung die Abscheidung voluminöser brauner Flocken, die aus $Fe(OH)_3$ bestehen, hervor[26]). Das Ausfallen dieser Flocken rührt wohl von einer Aufhebung der Schutzkolloidwirkung der Gelatine her. Die Farbvertiefung als Folge einer Melaninbildung könnte durch nicht glutinartige Verunreinigungen, z. B. durch in geringen Mengen vorhandene Eiweißkörper, welche die leicht abspaltbaren, Melanin bildenden Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Cystin enthalten, veranlaßt sein. Die genannten Indizien eines „chemischen" Abbaues würden also nicht das Glutin selbst betreffen.

Die Desaggregierung bringt ferner die sonst beim Verdünnen der Lösungen auftretende isoelektrische Trübung zum Verschwinden, ein Hinweis auf die Molekülverkleinerung. Andererseits wird mit fortschreitender Thermolyse an den konzentrierten Lösungen eine starke Fluoreszenz im auffallenden Sonnenlicht wahrgenommen, die auch als eine Folge der Desaggregierung gedeutet wurde[27]).

Die starke Abnahme des Quellungsvermögens und die völlige Vernichtung der Gelatinierfähigkeit bilden ebenfalls

---

[25]) Ders. & H. Bercht, Collegium 1922; S. 262; ders. Kolloid-Zeitschrift 33; 254 (1923).

[26]) O. Gerngross, O. Graf Triangi & P. Köppe, Ber. d. Dtsch. chem. Ges. 63; 1603 (1930).

[27]) H. Pringsheim & O. Gerngross, ebend. 61; 2009 (1928).

wichtige äußerliche Charakteristika der bei isoelektrischer Reaktion durchgeführten Thermolyse.

Im Röntgendiagramm der Gelatine bewirkt die Hitzebehandlung ein Verschwinden der „kristallinen K-Interferenzen", welches dem stufenweisen Abbau des Gitters bei der Zerkleinerung der größeren Teilchen entspricht[28]).

Somit ergibt sich folgendes Bild von der Desaggregierung der Gelatine:

Die durch Hitzebehandlung bewirkte Aufteilung der Gelatineteilchen geht im wesentlichen ohne Lösung von Peptidbindungen vor sich. Die stufenweise Thermolyse bedingt eine allmähliche Reduktion des Mizellargewichtes, vermutlich infolge der Auflösung der Querverbindungen.

II. Problemstellung und Zielsetzung.

Aus dem Vorhergehenden ergibt sich, daß wohl sichergestellt ist, daß die Thermolyse von Gelatine bei 100° und isoelektrischer Reaktion in den ersten Stunden ohne hauptvalenzchemischen Abbau, also als eine Desaggregierung, verläuft. Nach längerem Kochen tritt doch offenbar ein hydrolytischer Abbau von Polypeptidketten ein.

Es war nun interessant zu ermitteln, wie unterhalb 100°, also bei weniger stark erhöhter Temperatur, die Gelatine sich verhalten würde. Hier war wohl ein Absinken der physikalischen Eigenschaften, aber eine hydrolytische Spaltung nicht zu erwarten.

Sodann sollte ermittelt werden, welcher Art der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration oberhalb und unterhalb des isoelektrischen Punktes einer Gelatinelösung auf deren Viskosität und eventuell einsetzenden Peptidabbau wäre.

Außerdem war es von Interesse, ob auch an Lösungen anderer Eiweißstoffe, wenn diese bei einer nahe der Neutralität gelegenen Wasserstoffionenkonzentration einer Hitzebehandlung ausgesetzt werden, eine namhafte Desaggregierung nachweisbar wäre. Zu diesem Zwecke kamen eine Eialbumin- und eine Caseinlösung zur Untersuchung.

---

[28]) O. Gerngross & J. R. Katz, Naturwissenschaften 13; 901 (1925).
dies., Colloid-Ztschr. 39; 181 (1926).
dies., Ztschr. f. angew. Chem. 1927; S. 1443.

Vor allem war für die Lösung des ganzen erörterten Problems von Wichtigkeit, wie sich definierte Polypeptide bei der Thermolyse unter den Bedingungen verhalten würden, unter denen die Thermolyse der Proteine studiert wurde. Solche Modellversuche mußten in der Lage sein, am klarsten darüber Aufklärung zu schaffen, ob ein Hauptvalenzabbau stattfinden kann. Von besonderem Interesse war dabei zu prüfen, ob vielleicht mit Verlängerung der Kette, also unter Annäherung an die Molekülgröße der Eiweißkörper, die Spaltbarkeit erhöht würde.

Endlich nahm ich mir vor, zu untersuchen, ob der von O. Gerngroß und H. Pringsheim bei Gelatinelösungen beobachtete, mit der zwangsweisen Verkleinerung ihres Ballungszustandes einhergehende Anstieg der Eigenfluoreszenz im filtrierten Ultraviolettlicht unter analogen Bedingungen auch an Lösungen von Ovalbumin und Casein zu konstatieren wäre.

B. Experimenteller Teil.

I. Das Ausgangsmaterial.

1. Proteine:

a) Gelatine.

Für meine Untersuchungen benutzte ich ein Material von ganz besonderer Reinheit, eine elektroosmotisch[29]) gereinigte Gelatine, die nur leichte Gelbfärbung besaß.

Zur Ermittlung ihres Wassergehalts stellte ich 100 ccm einer 10%igen Gelatinelösung her und brachte einen daraus mehrmals entnommenen aliquoten Teil in einer flachen Aluminiumschale zur Einwage. Die Schale verblieb dann im elektrischen Trockenschrank bei 105° solange, bis die zu einem dünnen Film eingetrocknete Lösung genaue Gewichtskonstanz zeigte. Dieses Verfahren[30]) ist der üblichen Pulvertrockenmethode an Genauigkeit überlegen.

Zur Ermittlung des p_h-Wertes der Gelatine unterwarf ich stets 5%ige Lösungen bei 25° der elektrometrischen Messung mittels strömenden Wasserstoffes. Die Methode ist hinreichend bekannt[31]) und braucht daher hier nicht näher besprochen zu werden. Eine Sonderstellung nimmt die Gelatine nur insofern ein, als sie durch starke Schaumentwicklung das Arbeiten sehr erschwert. Um die hohe Viscosität der Lösungen zu mildern, arbeitete ich im Lufthermostaten bei 25°. Trotzdem mußte ich zu jeder Messung mit mindestens zweistündigem Durchleiten von Wasserstoff rechnen, um ein konstantes Potential zu erhalten. Auch führt Gelatine rasch

---

[29]) Vgl. Elektro-Osmose AG., D.R.P. 293 188; 293 762; AP. 1 577 660.

[30]) O. Gerngross, Ztschr. f. angew. Chem. 42; 969 (1929).

[31]) L. Michaelis, „Praktikum für Kolloidchem.", Berlin 1921; S. 44; 93 bis 95.

Verunreinigungen des Platinmohrs der Elektrode herbei, sodaß man zum Zwecke exakter Messungen schon nach drei bis vier Bestimmungen erneut platinieren muß.

Die hieraus gewonnenen wichtigsten Kennzahlen der verwendeten Gelatine waren die folgenden:

Tabelle I:

Kennzahlen der elektroosmotisch gereinigten Gelatine[32]*).*

Wasser	Asche	P_h in 0,5%iger Lösung bei 25°
15,3%	0,13%	5,00.

b) Eialbumin.

Ein reines Ovalbumin in Lamellen (von Schering-Kahlbaum) diente mir weiterhin als Ausgangsstoff.

Dem Protein waren folgende Kennzahlen eigen: Asche: 2,96%; Wasser: 13,05%.

Da, wie bekannt, unbehandeltes Ovalbumin ganz schwach sauer reagiert, und da ich möglichst in der Nähe des Neutralpunktes arbeiten wollte, so mußte ich vorsichtig die zur Neutralisation ausreichende Menge Lauge hinzusetzen. Die nötige Menge Lauge, die zur 9%igen Eialbuminlösung hinzuzusetzen war, um P_h-Werte von etwa 7 zu erreichen, stellte ich durch kolorimetrische Messung fest. Ich bediente mich dabei des Hellige-Komparators. In allen solchen Fällen habe ich mit dieser Apparatur im Vorversuch P_h-Messungen vorgenommen, die hernach potentiometrisch präzisiert wurden.

c) Casein.

Der von mir benutzte Stoff war ein fast farbloses reines Hammarsten-Casein von Merck-Darmstadt.

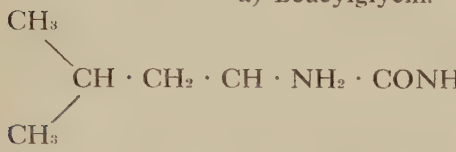
Infolge seines Säurecharakters kann dieses Protein als Caseinat gut in Lösung gebracht werden, während es an sich bei isoelektrischer Reaktion in Wasser völlig unlöslich ist. Da aber schon bei einem P_h-Wert unterhalb 7 Caseinlösungen herstellbar sind und ich überdies in der Nähe von P_h—7 arbeiten wollte, bereitete dies keine Schwierigkeiten.

[32]) Hergestellt von der Scheidemandel AG., Berlin.

Ich mußte nach vorangegangenem guten Durchquellen — analog wie bei Ovalbumin — auf dem dort geschilderten Wege durch vorsichtige Alkalizugabe und P_h-Kontrolle mittels des Helligekomparators möglichst nahe an den Neutralpunkt zu gelangen suchen, ohne ins alkalische Gebiet zu fallen.

2. Synthetisch gewonnene Peptide.

a) Leucylglycin.



Dieses Dipeptid stellte ich nach der Vorschrift E. Fischers dar[33]):

2,66 g Glykokoll, in 36 ccm n/1 NaOH gelöst, wurden portionsweise abwechselnd mit insgesamt 60 ccm n/1 NaOH und 9 g α-Bromisocapronylbromid versetzt. Dann gab ich 12 ccm 5 n-HCl hinzu, nahm mit Aether auf, engte stark ein und erhielt nach Zusatz von Petroläther α-Bromisocapronyl-glycin. Nach dem Waschen mit Petroläther und Umkristallisieren aus der 15 fachen Menge heißen Wassers erhielt ich insgesamt rd. 8 g reinen Bromkörper (entspricht 89% der Theorie).

Der Bromkörper wurde, in 40 ccm 25%igen Ammoniaks gelöst, vier Tage lang bei Zimmertemperatur stehen gelassen, die Lösung sodann auf dem Wasserbade, zuletzt unter Zusatz von Alkohol, verdampft und der trockene Rückstand mit Alkohol ausgekocht. Das Dipeptid wurde aus der 15 fachen Menge heißen Wassers umkristallisiert.

Ausbeute an Leucylglycin: 4,85 g (82% der Theorie).

Der Schmelzpunkt (243° korrigiert) entsprach dem der Literatur.

Zur Kontrolle wurde die Stickstoffbestimmung herangezogen: 0,094 g Dipeptid gaben 11 ccm Stickstoff ($t = 0°$; $p = 760$ mm) $= 0{,}0138$ g N $= 14{,}68\%$ Stickstoff (berechnet 14,89%).

---

[33]) E. Fischer, Annalen: 340; 142 (1905).

Es lag mithin das reine Dipeptid vor, sodaß ich in der Lage war, es unmittelbar für meine Untersuchungen zu verwenden.

b) Triglycyl-glycin.

$NH_2 \cdot CH_2 \cdot CO\,(NH \cdot CH_2 \cdot CO)_2\,NH \cdot CH_2COOH$

Zur Synthese dieses Tetrapeptides ging ich von 9,8 g Glycyl-glycinchlorhydrat aus[34]).

Ich stellte Chloracetyl-glycyl-glycin nach der Vorschrift[35]) daraus dar und erhielt sodann aus dem Chlorkörper das Diglycyl-glycin[36]) als farbloses Oel. Da ich nun gegenüber den bekannten Literaturangaben eine kleine Variation vornahm, möchte ich diese hier kurz beschreiben:

Das erhaltene Oel wurde mit 60 ccm siedend heißen Methylalkohols durchgearbeitet, um das mitgebildete Chlorammonium in Lösung zu bringen. Nach Zugabe der doppelten Menge Methylalkohols zum Rückstand kristallisiert NaCl, mit wenig organischer Substanz gemengt, aus. Zum klaren Filtrat setzte ich nochmals 60 ccm Methylalkohol und erhielt nach eintägigem Stehen ein Präparat, welches einheitlich Diglycyl-glycin war.

Ausbeute: 3,2 g (33% der Theorie).

Hieraus stellte ich, der Vorschrift entsprechend, 1,5 g Chloracethyldiglycyl-glycin[37]) dar. (34% der Theorie.) Der Chlorkörper lieferte hernach 0,9 g reines Tetrapeptid[38]). (Ausbeute: 65% der Theorie.)

Die Verbindung besitzt keinen Schmelzpunkt; ihre hinreichende Reinheit ergibt sich aus dem Stickstoffgehalt: 0,0369 g Substanz gaben 6,6 ccm Stickstoff ($t = 0^0$; $p = 760$ mm) = 0,0083 g N = 22,5% (berechnet: 22,75%).

---

[34]) E. Fischer und E. Fourneau, Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft 34; 2868 (1901).
[35]) E. Fischer, ebeda 37; 2486 (1904).
[36]) derselbe, ebenda 36; 2982 (1903).
[37]) S. unter 35.
[38]) E. Fischer, Ber. d. Dtsch. chem. Ges. 37; 2502 (1904).

II. Angewandte Methoden zur Ermittlung des chemischen Abbaues von Eiweißkörpern.

1. Alkalimetrische Bestimmung von Aminosäuren und Polypeptiden[39]).

Diese Methode beruht im wesentlichen auf dem Umstand, daß der Zusatz von absolutem Alkohol die alkalische Dissoziation verhindert. Die befreiten sauren Gruppen werden dann durch Titration mit Alkalien ermittelt. Entsprechend der Vorschrift verfährt man auf folgende Weise: Zunächst stellt man die Azidität der zu untersuchenden Eiweißlösung mittels n/5 alkoholischer Kalilauge unter Benutzung von Thymolphtalein als Indikator fest. Dann gibt man zur Lösung ein ihr gleiches Volumen siedend heißen absoluten Alkohols und titriert, bis der Indikator von farblos nach blau umschlägt (p_H etwa 9,8). Die hier herrschende Alkoholkonzentration (zwischen 40 und 50%) eignet sich zur Bestimmung der Polypeptide. Nunmehr setzt man zur Lösung so viel absoluten Alkohols hinzu, daß sie in Bezug auf Alkohol 96%ig wird. Die Titration auf schwachblau liefert dann den Gehalt an freien Aminosäuren.

Man erhält somit prinzipiell zwei Werte, von denen der erste die Polypeptide, der zweite die Aminosäuren angibt.

Bei der Titration auf Aminosäuren kommt man wohl mit einer Endkonzentration von 90% Alkohol durch; doch fordert diese Methode sehr hohe Unkosten. Ein größerer Nachteil des Verfahrens ist jedoch darin zu erblicken, daß in Alkohol schwer lösliche Stoffe, wie z. B. Gelatine, im Verlauf der Titration gefällt werden. Diese bewirken, wie sehr man auch durch Umschütteln für emulsionsartig feine Verteilung sorgen mag, eine empfindliche Störung des Farbumschlages.

Ein Vorzug dieser Methode gegenüber der allgemein bekannten Formoltitration besteht aber darin, daß neben den Aminosäuren noch die Polypeptide ermittelt werden können und die Störung eines Reaktionsgleichgewichtes völlig ausgeschlossen ist.

2. Messung des Aminosäurestickstoffs nach van Slyke[40]).

Dieses Verfahren übertrifft das vorhergehende weit an

[39]) R. Willstätter & E. Waldschmidt-Leitz, ebenda 54; 2988 (1921).

Genauigkeit; die Apparatur, deren es sich bedient, ist allerdings ein wenig kompliziert.

Grundsätzlich handelt es sich hierbei um die mit salpetriger Säure bewirkte Abspaltung molekularen Stickstoffs aus einer Aminosäurelösung. Alsdann wird der freigemachte Stickstoff in einer Hempelschen Bürette aufgefangen und dort volumetrisch ermittelt. Die hierfür erforderliche Apparatur ist nachstehend abgebildet.

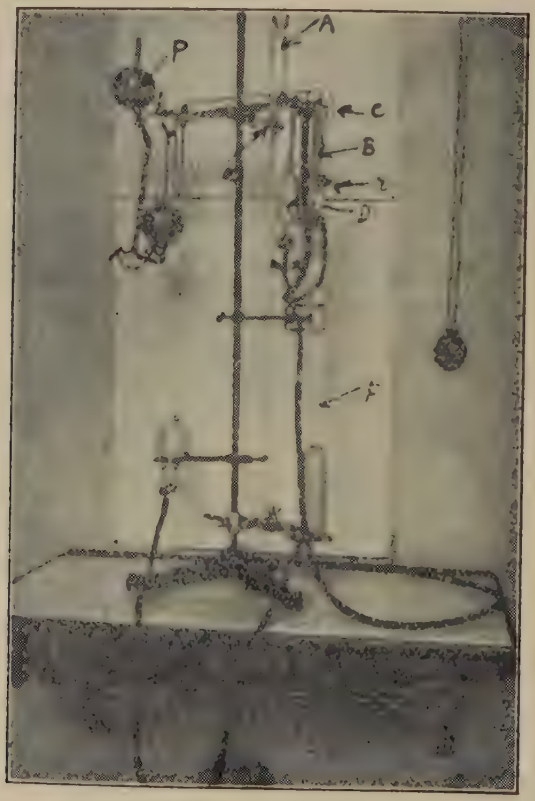


Abbildung 1: Der van Slyke-Apparat.

[10]) R.A.H. Plimmer, „Die Konstitution der Eiweißkörper", 1914.

Eine van Slyke-Bestimmung geht nun folgendermaßen vor sich:

1. Vertreibung der Luft aus dem Apparat mittels NO.

Die Bürette F ist vollständig mit Wasser gefüllt. In A füllt man jetzt so viel Eisessig ein, daß ein Fünftel des Volumens von D erfüllt wird; zu diesem Behuf ist in A eine Marke angebracht. Nun stellt man den Dreiweghahn bei c derart, daß D mit der Luft in Verbindung treten und der Eisessig in D einlaufen kann. Nunmehr wird eine 30%ige Natriumnitritlösung in A bis zu einer bestimmten Marke eingefüllt und durch den Hahn a zum Eisessig gegeben. Sobald die Flüssigkeitssäule nach dem Zufließenlassen über a steht, schließt man c, schüttelt etwas durch und sperrt das gebildete NO bei c ab. Man läßt das Gas bei c entweichen, schließt und schüttelt, öffnet nochmals und schüttelt endlich bei geschlossenem Dreiweghahn c und geöffnetem Hahn a solange, bis das Volumen in D bis zu einer eingeätzten Marke gesunken ist. Dann schließt man a und stellt c und den Vierweghahn r so ein, daß das Reaktionsgefäß D und die Bürette F mit einander verbunden sind.

2. Zersetzung der Aminosubstanz.

Die 10 ccm fassende Ansatzbürette B wird sodann mit der zu untersuchenden Aminosäurelösung gefüllt und eine gewünschte Menge davon nach D einlaufen gelassen. Hierauf schüttelt man fünf bis zehn Minuten lang das Reaktionsgefäß D; am besten wird diese Operation mit der Hand ausgeführt, weil dadurch größere Gleichmäßigkeit erzielt wird, als bei Anwendung des zum Apparat an sich gehörenden Motors, der daher auch in der Abbildung fortgelassen wurde. Sollte der Inhalt des Reaktionsgefäßes dabei sehr stark ins Aufschäumen geraten, so ist der Zusatz von reinstem sekundärem Octylalkohol sehr anzuraten; allerdings vermag Amylalkohol häufig gleich gute Dienste zu leisten.

3. Absorption des NO und Messung des N_2.

Wenn die Reaktion D beendet ist, drängt man das hier gebildete Gasgemenge von NO und N_2 durch Hinzugabe von Wasser in A von D in die Hempelsche Bürette F. Der bei

r befindliche Vierwegehahn wird jetzt so gestellt, daß das Gasgemisch in die mit einer alkalischen Permanganatlösung gefüllte Pipette P getrieben wird. Die Permanganatlösung enthält 50 g $KMnO_4$ und 25 g KOH im Liter Wasser. Durch eine Minute hindurch währendes Schütteln der Pipette P wird alles NO absorbiert. Der zurückbleibende reine Stickstoff wird erneut in die Bürette F gedrückt und durch Heben der Niveaukugel zur Messung gebracht.

Vor Ausführung der eigentlichen Analyse wird mit den Reagentien allein ein Leerversuch angestellt. Der hierbei sich ergebende Stickstoffbetrag — im Mittel 0,5 ccm — muß naturgemäß von dem bei der Analyse gefundenen Stickstoffwert in Abzug gebracht werden.

Die dem van Slyke-Prozeß zu Grunde liegenden chemischen Erscheinungen finden in den folgenden Darlegungen ihre Erklärung:

In dem Augenblick des Zutritts der Natriumnitritlösung zum Eisessig ist im Reaktionsgefäß eine momentane blaugrüne Färbung zu beobachten, die unter der Einwirkung der gelben Nitritlösung später nach grün umschlägt. Sie findet in der intermediären Bildung von salpetriger Säure, die dann in Salpetersäure und NO zerfällt, ihre Erklärung. Fließt nun eine Aminosäurelösung hinzu, so entweicht nach dem Schema:

$$-NH_2 + HNO_2 = N_2 + H_2O + HO-$$

Stickstoff. Das aus NO und N_2 bestehende Gemenge wird in der Pipette getrennt. Das NO wird durch $KMnO_4$ zu NO_2 oxydiert und von KOH sodann in ein Gemisch von KNO_2 + KNO_3 verwandelt, während $KMnO_4$ zu MnO_2 reduziert wird und der freie Stickstoff unangetastet bleibt.

III. Die durchgeführten Versuche.

A. Quantitative Untersuchungen bezüglich des Abbaues.

1. Hitzebehandlung einer 25%igen Gelatinelösung.

a) Bei einer Temperatur von 75°.

α) Bei einem p_h von 6,85.

Herstellung der Gelatinelösung:

25 g elektroosmotisch gereinigte, isoelektrische Gelatine wurden mit 59,57 g Wasser und 5 ccm n/1 NaOH 16 Stunden

lang durchgequollen und darauf durch vorsichtiges Schmelzen gelöst. Zwecks Verhinderung fermentativer Zersetzungen durch Mikroorganismen setzte ich einige Thymolkristalle hinzu.

P_h-Messung: Eine auf 0,5% Gelatine verdünnte Probe der 25%igen Lösung wurde im Luftthermostaten bei 25° einer potentiometrischen p_h-Messung unterworfen; $p_h = 6{,}85$.

Um die durch die vorzunehmende Thermolyse hervorgerufene physikalische Veränderung feststellen zu können, führte ich bei 30° und 40° mit je 25 ccm von auf 3% Gelatine verdünnten Proben der Stammlösung Viskositätsmessungen aus. Dabei benutzte ich ein Ostwald-Viskosimeter (Wasserwert für 30° bezw. 40°: 45 bezw. 39).

Die Kontrolle eines etwaigen Peptidabbaues bestand in der Ermittlung der Zunahme von freien Aminogruppen nach van Slyke und gelegentlich in der alkalimetrischen Bestimmung der freien Carboxylgruppen nach R. Willstätter und E. Waldschmidt-Leitz.

Die Thermolyse wurde in ausgekochten Jenaer Glasgefäßen durchgeführt. In Tabelle 2 sind die betreffenden Untersuchungen zusammengestellt.

Tabelle 2:

Viskosität, Willstätter-, Waldschmidt- Leitz- und van Slyke-Zahlen einer 25%igen, bei P_h 6,85 auf 75° erhitzten Gelatinelösung.

Erhitzungsdauer in Tagen	Viskosität 25 ccm 3%ig 30°	Viskosität 25 ccm 3%ig 40°	Willstätter-Waldschmidt-Leitz-Zahlen 10 ccm Peptide	Willstätter-Waldschmidt-Leitz-Zahlen 3%ig Amino-s.	van Slyke-Zahlen 1 ccm 3%ig entsprechen ccm N 0°, 760 mm	P_h 0,5%ig
0	3,09	2,5	0,30	0,40	0,73	6,85
6	1,70	1,62	0,35	0,40	0,73	
8	1,63	1,54	0,35	0,40	0,74	6,84
26	1,33	1,29			0,74	
34	1,32	1,28			0,74	6,08
45	1,27	1,25			0,79	6,08

Die in dieser Tabelle angegebenen Willstätter-Waldschmidt-Leitz-Zahlen verstehen sich in Kubikzentimeter n/5

alkoholischer Alkalilauge; desgleichen geben die van Slyke-Zahlen die gemessenen Kubikzentimeter Aminosäurestickstoff wieder. Dies soll analog auch in den folgenden Tabellen zum Ausdruck gebracht werden.

Es ist also zu ersehen, daß ein Hauptvalenzabbau im Sinne einer Lösung von Peptidbindungen selbst nach einer Erhitzung von 45 Tagen kaum zu konstatieren ist. Der Zuwachs der van Slyke-Zahl beträgt maximal 8,2%. Die Viskosität hingegen ist bis auf 12,9% ihres Anfangswertes gefallen. Die anfangs gelbe Lösung hatte dunkelbraune Färbung angenommen.

Nach 34tägiger Thermolyse zeigte sich überraschend, daß der p_h-Wert von 6,85 auf 6,08 gesunken war. Es ergibt sich nun die Frage, wie dieser sich erst nach 34-tägiger Hitzebehandlung äußernde p_h-Abfall zu deuten sei. Es ist zu vermuten, daß der Säurecharakter des Desinfektionsmittels hierfür verantwortlich zu machen ist. Wahrscheinlich wird allmählich zur Neutralisation des Thymols Alkali verbraucht, und das nach dieser Bindung noch freibleibende Alkali müßte dem p_h von 6,08 entsprechen. Schließlich ist man es ja gewöhnt, daß sich Reaktionen in einem so stark negativ katalytischen Medium, wie es die Gelatine darstellt, nur sehr langsam vollziehen.

β) bei einem p_h von 6,1.

17,74 g elektroosmotisch gereinigte, isoelektrische Gelatine wurden unter Zugabe von sehr wenig NaOH in 42,26 g Wasser eingequollen und später durch Schmelzen nach der gewöhnlichen Art in Lösung gebracht. Das Wasser war jedoch zuvor mit Toluol gesättigt worden, und die so hergestellte 25%ige Gelatinelösung wurde zwecks guter Sterilität mit Toluol überschichtet. Ich wählte Toluol als Desinfektionsmittel, weil es im Gegensatz zum Thymol mit Alkali nicht in Reaktion zu treten vermag und dabei ebenfalls stark antiseptische Eigenschaften besitzt.

Die Befunde erhellen aus folgender Uebersicht:

Tabelle 3.

Viskosität und van Slyke-Zahlen einer 25%igen, bei p_h 6,1 auf 75° erhitzten Gelatinelösung.

Erhitzungsdauer in Tagen	Viskosität 25 ccm 3%ig 30°	Viskosität 25 ccm 3%ig 40°	van Slyke-Zahlen 1 ccm 3%ig	p_h 0,5%ig
0	3,6	2,3	0,75	6,1
15	1,24	1,28	0,75	6,1
26	1,23	1,17	0,80	6,1

Es zeigt sich auch hier, daß, nachdem die Viskosität bei 30° schon auf 8,8% ihres Anfangswertes nach nur 26tägiger Desaggregierung angelangt ist, eine Hydrolyse lediglich spurenweise eingetreten ist. Die van Slyke-Zahl hat gegenüber ihrem Anfangswert eine Steigerung um 6,6% erfahren.

Was jedoch von viel gewichtigerer Bedeutung ist und hierbei nie außer Acht gelassen werden darf, das ist die Tatsache, daß der bei jeder Viskositäts- und Stickstoffmessung kontrollierte p_h völlige Konstanz erkennen läßt. Das zeigt die Berechtigung der Annahme, daß nach Zugabe von Alkali-Thymol als Desinfektionsmittel nicht benutzt werden darf. Das zuvor beobachtete enorme Absinken des p_h ist mithin wohl ohne Zweifel auf die an jener Stelle mitgeteilte Annahme zurückzuführen, sodaß man doch sicherlich von einem Alkaliverbrauch durch das Thymol sprechen darf. Die bei absoluter Konstanz der Wasserstoffionenkonzentration gewonnenen Befunde sollen im Anhang (Diagramme II und III) in graphischer Darstellung eine Illustration finden.

Der besseren Vergleichsmöglichkeit wegen bringe ich Vikositätsabfall und Zunahme der van Slyke-Werte in einem gemeinsamen Kurvenbild (Anhang Diagramm IV).

Den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf Viskosität und Peptidabbau erfährt man, wenn man bei gleicher Temperatur gleich lange erhitzte Gelatinelösungen miteinander vergleicht. Diese aus den beiden vorangehenden Tabellen herausgegriffenen Vergleichswerte enthält nun folgende Uebersicht:

Tabelle4.

Viskositätsabnahme und Zuwachs der van Slyke-Zahlen einer 26 Tage bei p_h 6,85 bezw. 6,1 auf 75° erhitzten Gelatinelösung.

p_h	Viskositätsabfall 30°	Viskositätsabfall 40°	van lyke-Zunahme
6,85	84,3%	80,7%	1,4%
6,1	91,2%	87,0%	6,6%

Die stets wahrgenommene Farbvertiefung der Gelatinelösungen bei der Thermolyse ist als Kennzeichen einer chemischen Veränderung im Sinne eines hydrolytischen Abbaus zu deuten, sodaß es von Interesse ist, sie quantitativ zu verfolgen.

Eine 25%ige Gelatinelösung vom p_h 6,9 verbrachte ich zu diesem Zweck in einen konstant auf 50° gehaltenen Thermostaten. Die folgenden für die Farbe mitgeteilten Zahlen geben die Anzahl Kubikzentimeter einer n/10-Jodlösung in 100 ccm eines farblosen Lösungsmittels an, welche dieselbe Farbtiefe besitzen:

Tabelle 5.

Farbmessung an 25%iger, bei p_h 6,9 auf 50° erhitzter Gelatinelösung.

Erhitzungsdauer in Tagen	Farbe
0	0,50
3	0,50
6	0,50
9	1,00
12	1,25
14	1,25

Man sieht, daß die Intensität der Färbung schon nach vierzehn Tagen auf das 2½fache ihres Anfangswertes gestiegen ist.

γ) bei einem p_h von 7,94.

Aus 25 g Gelatine, die in 59,57 g Wasser unter Zusatz von 6,25 ccm n/1NaOH, wie immer, 16 Stunden lang ge-

quollen waren, stellte ich meine Untersuchungslösung her. Ich sterilisierte mit Thymol und konnte so meine zuvor damit gemachten Erfahrungen nochmals kontrollieren.

Es zeigte sich nun abermals ein Absinken des p_h bis unter den Neutralpunkt, was die früher gemachten Feststellungen sehr weitgehend unterstützt. Daher darf man wohl sicher sein, daß die anfangs entwickelte Ansicht über die mangelnde Eignung des Thymols als Desinfektionsmittel in all den Fällen, wo Alkali zugesetzt wurde, berechtigt ist.

Die gefundenen Daten enthält:

Tabelle 6.

Viskosität, Waldschmidt- Leitz- und van Slyke-Zahlen einer 25%igen, bei 75° erhitzten, mit Thymol sterilisierten Gelatinelösung vom p_h 7,94.

Erhitzungsdauer in Tagen	Viskosität 25 ccm 5%ig		Willstätter-Waldschmidt-Leitz-Zahlen 10 ccm 3%ig		van Slyke-Zahlen 1 ccm 5%ig	p_h 0,5%ig
	30°	40°	Peptide	Amin.		
0	3,09	2,6	0,25	0,35	0,74	7,94
4	1,67	1,47	0,07	0,60	0,82	
6	1,58	1,48	0,17	0,60	0,82	
21	1,49	1,42			0,93	6,8
32	1,48	1,40			0,99	6,8

Neben dem gewohnten enormen Abfall der Viskosität fällt hier sogleich der mächtige Zuwachs der van Slyke-Werte ins Auge, der sich bis zu 33,8% des Anfangsbetrages erhebt. Auch muß hervorgehoben werden, daß nach 21tägiger Hitzebehandlung alle Bemühungen, den p_h-elektrometrisch zu ermitteln, leider völlig ergebnislos waren. Selbst nach mehr als siebenstündigem Einleiten von Wasserstoff war kein konstantes Potential zu erhalten, was bei isoelektrischer Gelatine stets innerhalb zwei Stunden gelang. Diese Erfahrung wurde auch bereits von anderer Seite gemacht.[41]) Es scheint nicht nur die Desaggregierung, sondern auch die Entfernung vom isoelektrischen Punkt hierbei eine Rolle zu spielen.

[41]) O. Graf Triangi, Dissertation Technische Hochschule Berlin, 1929.

Daher ermittelte ich den herrschenden p_h mittels des Hellige-Komparators, der ja übrigens recht genaue Werte liefert (Tolerans 0,05 p_h). So verfuhr ich künftig immer, wenn eine potentiometrische Messung unmöglich war. Denn es ist immer noch besser, mit einer etwas weniger fein abgestimmten Apparatur einen immerhin brauchbaren p_h-Wert zu messen, als bei Untersuchungen, wie diesen hier, über die Wasserstoffionenkonzentration ganz im unklaren zu sein.

Wollte man etwa für das starke Absinken des p_h das zum Verdünnen der 25%igen Untersuchungslösung benutzte destillierte Wasser, welches eine minimale Azidität besitzt, verantwortlich machen, so genügt das zur Erklärung eines solchen Befundes durchaus nicht. Eine andere Probe des 25%igen Sols nämlich verdünnte ich mit Leitungswasser auf die gewünschte Gelatinekonzentration von 0,5% und fand nunmehr einen p_h von 7,0. Es ist also dem p_h des zur Lösung verwendeten Wassers trotz der guten Pufferung der Gelatinelösungen ein ganz verschwindender Einfluß auf den p_h der Lösung wohl zuzubilligen; den starken p_h-Abfall in den Fällen, wo zuvor Alkali zugesetzt wurde, erklärt dies jedoch keineswegs. Es ist bedeutend wahrscheinlicher, daß zwischen der zugegebenen Lauge und dem Thymol Neutralisation eintritt. Daß ein daherrührendes starkes Absinken der Wasserstoffionenkonzentration erst nach einer so großen Zeitspanne erkennbar wird, ist mit den bekannten negativ katalytischen Eigenschaften der Gelatine durchaus in Uebereinstimmung.

δ) bei einem p_h von 8,3.

Nunmehr bereitete ich mir eine neue 25%ige Gelatinelösung vom p_h 8,3 und sterilisierte sie mit Toluol in der schon beschriebenen Weise.

Bei bis zu 26 Tagen ausgedehnter Hitzebehandlung zeigte sich eine sehr gute Konstanz der Wasserstoffionenkonzentration; sie konnte allerdings nur noch kolorimetrisch verfolgt werden, weil bei allen elektrometrischen Versuchen ein konstantes Potential nie — außer vor Beginn der Thermolyse — zu erhalten war.

Die Viskosität sank wie stets gewaltig, der van Slyke-Wert stieg maximal um 21,6%. Auch dies bedeutet im alkalischen Gebiet lediglich einen relativ unerheblichen Abbau.

Die Analysenergebnisse sind in einer Tabelle zusammengestellt:

Tabelle 7:

Vikosität van Slyke-Zahlen und p_h einer bei 75° und p_h 8,3 erhitzten 25%igen Gelatinelösung.

Erhitzungsdauer in Tagen	Viskosität 25 ccm 8%ig 30°	40°	van Slyke-Zahlen 1 ccm 3%ig	p_h
0	2,2	1,9	0,74	8,3
15	1,2	1,14	0,78	8,3
26	1,19	1,14	0,90	8,3

Anschließend bringe ich die an dieser Gelatinelösung gewonnenen Resultate in graphischer Darstellung im Anhang (Diagramm V und VI).

Bezüglich der Viskositätsänderung sowie des Abbaues von Gelatinelösungen in Abhängigkeit vom p_h lassen sich auf Grund des nunmehr vorliegenden Materials folgende tabellarischen Zusammenstellungen geben:

Tabelle 8.

Viskositätsabfall und Anstieg der van Slyke-Zahlen einer 15 Tage auf 75° erhitzten 25%igen Gelatinelösung.

p_h	Viskositätsabfall 30°	40°	van Slyke-Anstieg
6,1	90,8%	84,5%	0
8,3	83,4%	84,5%	5,4%

Man sieht sogleich, daß der Viskositätsabfall bei p_h 6,1 den bei alkalischer Reaktion ermittelten übertrifft, wiewohl bei p_h 6,1 im Gegensatz zur alkalischen Lösung kein Abbau zu erkennen ist.

Tabelle 9.

Viskositätsabfall und Anstieg der van Slyke-Zahlen einer 26 Tage auf 75° erhitzten 25%igen Gelatinelösung.

p_h	Viskositätsabfall 30°	40°	van Slyke-Anstieg
6,85	84,3%	80,7%	1,4%
6,1	91,2%	87,0%	6,6%
8,3	83,4%	84,5%	21,6%

Die Minderung der Viskosität ist überall sehr bedeutend, ist aber dem schon nach fünfzehntägiger Hitzebehandlung eingetretenen Abfall kaum überlegen. Hingegen hat nach längerer Thermolyse, zumal bei alkalischer Reaktion, deutlicher Peptidabbau eingesetzt. Dennoch ist zu beachten, daß fast die gesamte Abnahme der Viskosität sich vollzieht, noch ehe ein nennenswerter hauptvalenzchemischer Abbau beginnt.

ε) bei einem p_H von 5,00.

73,9 g elektroosmotisch gereinigter, isoelektrischer Gelatine wurden nach dem üblichen 16stündigen Durchquellen mit 176,1 g Wasser durch vorsichtiges Schmelzen im schrittweise bis auf 40° angeheiztem Wasserbad in Lösung gebracht. Nach Zugabe von 0,1% Thymol hatte ich so eine sterile 25%ige Lösung von isoelektrischer Gelatine zur Verfügung.

Diese Lösung, die ich besonders lange zu untersuchen gedachte, stellte ich nach Messung der Anfangswerte der Viskosität, der van Slyke-Zahl und des p_H in einen konstant auf 75° gehaltenen Thermostaten ein.

Die Lösung vertiefte mit der Zeit ihre Farbe außerordentlich. Es waren auch später viele Flocken in ihr wahrzunehmen, die aus $Fe(OH)_3$ bestehen und, wie bereits auseinandergesetzt, der verminderten Schutzkolloidwirkung ihre Entstehung verdanken.

Der p_H sank nach 48tägiger Hitzebehandlung um nur 1% seines Anfangswertes, sodaß man ihn im ganzen als befriedigend konstant betrachten konnte.

Die Waldschmidt-Leitz-Zahlen wurden hin und wieder zum Vergleich herangezogen.

Im Verlaufe der in diesem Falle 90tägigen Hitzebehandlung sank die Viskosität bis auf rund 11% ihres Anfangswertes. Diese starke Verminderung fällt erst richtig ins Gewicht, wenn man bedenkt, daß die Gelatine bei isoelektrischer Reaktion schon an und für sich ein Minimum der Viskosität aufweist.

Die van Slyke-Zahl stieg bereits nach fünftägiger Thermolyse um 5,4%, blieb bis zum 23. Tage konstant und stieg sodann allmählich bis um insgesamt 51,4%. Vom 33. Tage ab setzte eine weitgehende Peptolyse ein.

Uebersichtliche Einzelheiten über die gemessenen Größen zeigt Tabelle 10.

Tabelle 10.

Viskosität, Waldschmidt- Leitz-, van Slyke-Zahlen und p_h einer 25%igen, bei isoelektrischer Reaktion auf 75° erhitzten Gelatinelösung.

Erhitzungsdauer in Tagen	Viskosität 25 ccm 3 %ig 30°	Viskosität 25 ccm 3 %ig 40°	Willstätter-Waldschmidt-Leitz-Zahlen 10 ccm 3%ig Peptide	Willstätter-Waldschmidt-Leitz-Zahlen 10 ccm 3%ig Amin.	van Slyke-Zahlen 1 ccm 3%ig	p_h 0,5%ig
0	2,3	1,99	0,20	0,40	0,74	5,00
5	1,42	1,32	0,25	0,40	0,78	
8	1,35	1,27	0,25	0,40	0,78	
15	1,32	1,25	0,25	0,40	0,78	4,94
23	1,25	1,22	0,25	0,40	0,78	
33	1,25	1,22			0,82	
48	1,23	1,22			1,07	4,95
59	1,22	1,18			1,09	4,95
90		1,11	0,30	0,50	1,12	

Die beiden im Anhang erscheinenden Diagramme VII a und b bringen die bei der Thermolyse der isoelektrischen Gelatinelösung maßgebenden Tatsachen noch einmal zum Ausdruck.

Durch diese Untersuchungen ergibt sich für den Einfluß des p_h auf Viskosität und hydrolytische Spaltung ein neues Beispiel:

Tabelle 11.

Viskositätsabfall und Anstieg der van Slyke-Zahl einer 15 Tage auf 75° erhitzten 25%igen Gelatinelösung.

p_h	Viskositätsabfall 30°	Viskositätsabfall 40°	van Slyke-Anstieg
6,1	90,8%	85,4%	0
8,3	83,4%	84,5%	5,4%
4,94	75,4%	76,7%	5,4%

Bei isoelektrischer Reakton sind nach 15 Tagen gleich viel Peptidbindungen gelöst worden, wie bei p_h 8,3. Der Viskositätsabfall bei alkalischer Reaktion ist aber dem beim isoelektrischen Punkt ermittelten erheblich überlegen.

Tabelle 12.

Viskositätsabfall und Anstieg der van Slyke-Zahl einer 8 Tage auf 75° erhitzten 25%igen Gelatinelösung.

p_h	Viskositätsabfall 30°	Viskositätsabfall 40°	van Slyke-Anstieg
6,84	70 %	64 %	1,4%
5,00	73,1%	72,7%	5,4%

Nach achttägiger Hitzebehandlung erweist sich, wie man sieht, die Viskositätsminderung bei isoelektrischer Reaktion beträchtlicher als bei p_h 6,84. Der Peptidabbau ist in beiden Fällen noch immerhin als relativ geringfügig anzusehen.

Nach Ablauf der 90tägigen Hitzebehandlung trat in der 25%igen Lösung selbst bei 0° keine Gelatinierung mehr ein; dagegen zeigte sie eine starke grünliche Fluoreszenz im auffallenden Sonnenlicht. Ihr Geruch war schwach leimartig.

Eine erneut hergestellte 25%ige isoelektrische Gelatinelösung unterwarf ich, während ich sie vierzehn Tage lang bei 50° im Thermostaten beließ, mehreren kolorimetrischen Messungen.

Tabelle 13.

Farbmessungen an 25%iger bei isoelektrischer Reaktion auf 50° Grad erhitzter Gelatinelösung.

nach Tagen	Farbe ccm n/10 Jod in 100 ccm
0	0,40
3	0,40
6	0,40
9	0,50
12	0,50
14	0,50

Die gelbe Färbung der Lösung hat sich also nach 14tägiger Erhitzung auf 50° um 25% ihres Anfangsbetrages verdunkelt. Mit fortschreitender Erhitzungsdauer und gesteigerter Erhitzungstemperatur vertieft sich die Farbe mehr und mehr und führt schließlich zu jenen tiefbraunen Lösungen, wie sie nach sehr weitgehender Desaggregierung zu beobachten sind.

Einen Vergleich mit früheren Daten gibt

Tabelle 14.

Farbtiefe 25%iger auf 50° erhitzter Gelatinelösungen.

p_h	Farbtiefe	
	nach 0 Tagen	nach 14 Tagen
5,00	0,40	0,50
6,9	0,50	1,25

Die Vertiefung der Farbe bei isoelektrischer Reaktion tritt also hinter den bei p_h 6,9 gemachten Befund bei weitem zurück. Auch ist die Feststellung von Interesse, daß, wie Tabelle 14 zeigt, eine fast neutrale Gelatinelösung dunkler als eine ihr sonst gleiche isoelektrische ist.

b) bei 50° und p_h 4,3.

Endlich stellte ich eine 25%ige Gelatinelösung her, die ich durch vorsichtige Zugabe von Salzsäure auf einen elektrometrisch ermittelten p_h-Wert von 4,3 brachte. Diese Lösung unterwarf ich im konstant auf 50° gehaltenen Thermostaten einer insgesamt 15tägigen Hitzebehandlung.

Die Viskosität ließ einen langsameren Abfall als bei den bisher gewählten Bedingungen erkennen. So war sie nach 15tägiger Behandlung, bei 30° gemessen, auf 52,6% und, bei 40° gemessen, auf 59,1% ihres ursprünglichen Betrages angelangt.

In der gleichen Zeit waren die van Slyke-Zahlen gegenüber ihrem Grundwert um 18,1% gestiegen, so daß von einem erheblichen Abbau gesprochen werden kann.

Nähere Angaben enthält

Tabelle 15.

Viskosität, van Slyke-Zahlen und Farbmessung an einer 25%igen bei 50° erhitzten Gelatinelösung vom p_h 4,3.

nach Tagen	Viskosität 3%ig		van Slyke 1 ccm 3%ig	Farbe 25%ig
	30°	40°		
0	2,33	1,93	0,72	0,20
3	2,08	1,82	0,79	0,20
6	1,95	1,79	0,79	0,26
9	1,85	1,71	0,79	0,30
12	1,83	1,67	0,83	0,35
15	1,70	1,55	0,85	0,35

Die bezüglich der Viskosität und der van Slyke-Zahlen maßgebenden Verhältnisse werden durch entsprechende graphische Darstellungen im Anhang (Diagramme VIII und IX) noch anschaulicher werden.

Interessant ist ferner ein Vergleich der nach dem 15-tägigen Ablauf der Thermolyse ermittelten Daten mit den in analogen Fällen gemessenen Werten, wenn nicht deren Anfangsbeträge, sondern ihre Abnahme bzw. ihr Zuwachs einander gegenübergestellt werden.

Dies zeigt die folgende Zusammenstellung:

Tabelle 16.

Viskositätsabnahme und Zuwachs der van Slyke-Zahl einer 15 Tage erhitzten Gelatinelösung.

Erhitzungstemperatur	p_h	Viskositätsabnahme 30°	Viskositätsabnahme 40°	van Slyke-Zuwachs
75°	6,1	90,8%	85,4%	0
75°	8,3	83,4%	84,5%	5,4%
75°	4,94	75,4%	76,7%	5,4%
50°	4,3	47,4%	40,9%	18,1%

Die Tabelle zeigt, daß bei p_h 8,3 und p_h 4,94 innerhalb dieses Zeitraumes ein geringfügiger gleich großer Abbau eingesetzt hat, daß aber die Hitzebehandlung im alkalischen Gebiet eine stärkere Minderung der Viskosität hervorzurufen vermag, als bei isoelektrischer Reaktion.

Noch tiefer ist die Viskosität bei p_h 6,1 gesunken, obschon die Erhitzungstemperatur (75°) dieselbe und ein hauptvalenzchemischer Abbau überhaupt nicht wahrzunehmen ist.

Bei p_h 4,3 ist die Viskositätsabnahme zwar sehr deutlich, im Vergleich zu den anderen Gelatinelösungen jedoch nicht bedeutend. Allerdings liegt die Erhitzungstemperatur ja um 25° niedriger als sonst, und auffallend ist hierbei, daß eine relativ sehr starke Lösung von Peptidbindungen erfolgt.

Man wird jedenfalls zu dem Schluß geführt, daß die Hitzedesaggregierung von Gelatinelösungen im wesentlichen so vor sich geht, daß Peptidbindungen dabei nicht gelöst werden.

Schließlich mögen noch die kolorimetrischen Messungen an dieser Gelatinelösung in Parallele zu entsprechenden

Untersuchungen, die unter anderen Bedingungen durchgeführt wurden, gesetzt werden.

Tabelle 17.

Farbtiefe 25%iger bei 50° erhitzter Gelatinelösungen.

p_h	Farbtiefe nach 0 Tagen	Farbtiefe nach 12 Tagen	Zunahme nach 12 Tagen
5,00	0,40	0,50	25%
6,9	0,50	1,25	150%
4,3	0,20	0,35	75%

Sogleich fällt die geringe Intensität der Färbung einer unvorbehandelten Gelatinelösung vom p_h 4,3 auf. Jedoch dunkelt sie während des Ganges der thermischen Desaggregierung erheblich nach, wenn auch eine bei p_h 6,9 erhitzte Lösung ihre Farbe stärker verdunkelt. Die Zunahme der Farbtiefe einer isoelektrischen Lösung erweist sich bei der Temperatur von 50° als relativ gering, wenngleich sie auch hier durch den bloßen Augenschein bereits sicher erkannt werden kann. Auch die Grundfärbung der unbehandelten Lösung ist, wie man sieht, vom p_h abhängig.

2. Hitzebehandlung einer 9%igen Ovalbuminlösung bei 50° und p_h 6,9.

25 g Eialbumin wurden nach vorangegangener 16stündiger Quellung in 127,5 g Wasser unter Zusatz von 4 ccm n/1 NaOH gelöst. Die noch trübe Lösung filtrierte ich unter sterilen Bedingungen durch Mull und machte hinterher eine Konzentrationsbestimmung, analog der bei der Gelatine schon eingangs beschriebenen Methode. So stellte ich fest, daß ich eine genau 9%ige Lösung von dem potentiometrisch bestimmten p_h 6,9 vor mir hatte.

Ich untersuchte sie im Thermostaten bei 50°.

Die Viskosität war so gering, daß ich sie, ohne zu verdünnen, in der 9%igen Stammlösung direkt bestimmte. Zur van Slyke-Bestimmung dagegen verdünnte ich wie üblich auf 3% Ovalbumin.

Während des Ganges der Hitzebehandlung zeigte sich in der Lösung eine langsam zunehmende Trübung, die aber

ihrer Feinheit wegen durch Filtrieren nicht beseitigt werden konnte. Daher zeigte auch die Viskosität dann einen dauernden kleinen Zuwachs. Nun kommt eine Koagulation des Albumins bei 50° aber keineswegs in Frage. Vielleicht ist diese leichte Trübung auf Grund der von Sörensen entwickelten Vorstellung von den Proteinen als reversibel dissoziablen Komponentensystemen zu deuten. Es könnte immerhin sein, daß die Hitzebehandlung eine Dissoziation des gerade bestehenden Komponentensystems hervorruft und daß hierbei ein Komponentensystem von geringerer Löslichkeit resultiert.

Wenn infolgedessen die Viskositätswerte an Bedeutung verlieren, so kommt den van Slyke-Zahlen um so mehr Beachtung zu. Unbeschadet ihres kleinen Anstieges, der sie nach 15tägiger Hitzebehandlung allmählich um maximal 9,4% erhöht, zeigen sie klar auf, daß ein sehr ins Gewicht fallender hydrolytischer Abbau noch nicht einsetzt. Um nun die Frage, ob hierbei eine Desaggregierung stattfindet oder nicht, beantworten zu können, habe ich späterhin Fluoreszenzbestimmungen vorgenommen, welche unter den qualitativen Untersuchungsmethoden eine Besprechung finden werden.

Erwähnt muß werden, daß der p_H absolut konstant blieb.

Es ist ferner von Bedeutung, daß an dem Geruch, welcher fast täglich überprüft wurde, kein Merkmal eines tieferen Abbaues zu konstatieren war.

Zum Zwecke der Sterilisation war die Albuminlösung von Anfang an mit Toluol überschichtet worden. Die gemessenen Werte enthält

Tabelle 18.

Viskosität, van Slyke-Zahlen und Farbmessung einer 9%igen auf 50° erhitzten Eialbuminlösung.

nach Tagen	Viskosität 9%ig		van Slyke	Farbe der
	30°	40°	1 ccm 3%ig	9%igen Lösung
0	1,95	1,89	0,85	0,14
1	1,95	1,89	0,85	0,14
2	1,95	1,89	0,85	0,14
3	1,93	1,88	0,85	0,14
6	1,93	1,88	0,85	0,14

nach Tagen	Viskosität 9%ig		van Slyke 1 ccm 3%ig	Farbe der 9%igen Lösung
	30°	40°		
7	2,10	1,97	0,85	0,14
8	2,2	2,08	0,85	0,16
10	2,3	2,2	0,85	0,20
12	2,7	2,6	0,92	0,20
13	2,6	2,5	0,93	0,23
14	2,6	2,5	0,93	0,23
15	2,5	2,4	0,93	0,26

Auch ist aus der Tabelle zu ersehen, daß eine relativ kleine Farbvertiefung einhergegangen ist. Nach Ablauf der 15tägigen Hitzebehandlung belief sich ihr Zuwachs auf 85,7% der ursprünglichen Intensität.

Durch die im Anhang gebrachten Diagramme X und XI werden sich die Verhältnisse noch anschaulicher darstellen lassen.

3. Hitzebehandlung einer 15%igen Caseinlösung bei 50° und p_h 6,74.

Durch Lösen von 22,5 g Hammarsten-Casein von besonderer Reinheit nach dem Einquellen in 127,5 g Wasser unter Zugabe von 11 ccm n/1 NaOH erhielt ich eine genau 15%ige Caseinlösung (p_h elektrometrisch = 6,74).

Die 15%ige, nahezu neutrale Lösung wurde sodann 15 Tage lang auf einer Temperatur von 50° gehalten.

Die Viskosität war in 3%iger Verdünnung zu gering, um brauchbare Vergleichswerte liefern zu können. Sie wurde deshalb in der 15%igen Lösung direkt bestimmt.

Die van Slyke-Bestimmung gestaltete sich nicht ganz so einfach wie sonst, weil Casein bekanntlich eine momentane Säurekoagulation erleidet und bei diesem Verfahren, das mit Nitrit und Eisessig arbeitet, die größte Vorsorglichkeit in dieser Beziehung am Platze ist. Nun stellte ich aber an Hand genauer Vorversuche fest, daß in einem Ueberschuß von Eisessig das bereits zuvor koagulierte Casein wieder löslich ist; und zwar wird die Koagulation völlig vermieden, wenn eine 3%ige Caseinlösung mit dem ihr gleichen Volumen Eisessig vorher versetzt worden ist. Ich arbeitete also zur van Slyke-Bestimmung in verdünnter, 3%iger Caseinlösung, die ich vor-

her mit dem gleichen Volumen Eisessig versetzte. So konnte ich ohne Mühe die analytische Bestimmung des Aminosäurestickstoffes in der gewohnten Art durchführen. Rein rechnerisch folgte daraus eben, daß ich nur die Hälfte des analysierten Flüssigkeitsvolumens einsetzen durfte.

Die van Slyke-Zahlen stiegen verhältnismäßig stark an, maximal um 57,7% ihres ursprünglichen Wertes. Daß dieser van Slyke-Zuwachs erst am sechsten Tage nach vorher völliger Konstanz plötzlich auftrat, ist äußerst merkwürdig. Vielleicht hat hier trotz der immer angestrebten Sterilität eine bakterielle Zersetzung Platz gegriffen. Jedenfalls wäre es mit Rücksicht auf diese erstaunliche Tatsache durchaus angezeigt, zur Auswertung der Ergebnisse nur die an den ersten drei Tagen der Hitzebehandlung gemachten Befunde maßgebend heranzuziehen.

Aehnlich wie beim Eialbumin begann auch bei diesem Protein nach achttägiger Thermolyse die Viskosität, die anfangs enorm hoch und auch bereits stark abgefallen war, ein wenig anzusteigen. Tags darauf fiel sie minimal, stieg dann wiederum geringfügig und fiel wieder permanent ab. Die Lösung ließ auch eine ganz leichte Trübung erkennen. Jedoch erfolgte dies alles in weit geringerem Maße als beim Ovalbumin, und der geradezu verheerende Abfall der Viskosität, im ganzen gesehen, kann keinen Augenblick in Frage stehen. Es hat zweifellos eine bedeutende Desaggregierung eingesetzt.

Die Erklärung für die vorerwähnten leichten Trübungserscheinungen ist wohl — wie schon beim Eialbumin erörtert wurde — auf dem Boden der Sörensenchen Anschauungen über die Eiweißkörper als Komponentensysteme zu suchen.

Tabelle 19.

Viskosität, van Slyke-Zahlen und Farbmessung einer 15%igen, bei p_H 6,74 auf 50° erhitzten Caseinlösung.

nach Tagen	Viskosität 15%ig		van Slyke 3%ig	Farbe 15%ig
	30°	40°		
0	32,6	18,2	1,11	0,30
1	24,5	15,5	1,11	0,30
2	17,3	12,8	1,11	0,30
3	15,7	12,0	1,11	0,40
6	11,6	9,2	1,30	0,40

nach Tagen	Viskosität 15%ig 30°	4,0	van Slyke 3%ig	Farbe 15%ig
7	10,1	8,7	1,40	0,45
8	13,5	10,2	1,40	*0,45*
9	12,7	10,7	1,50	0,50
10	13,2	11,5	1,50	0,50
12	13,1	11,3	1,65	0,50
13	13,0	11,1	1,71	0,50
14	13,0	11,1	1,75	0,50
15	11,6	10,6	1,75	0,50

Es ist auch hier zu ersehen, daß die Lösung allmählich dunklere Färbung angenommen hat; der maximale Zuwachs der Farbtiefe beträgt in diesem Falle rund 67%.

Auch hier werden die zusammengehörigen Meßbefunde mit Hilfe graphischer Darstellungen (siehe Anhang Diagramme XII und XIII) anschaulicher werden.

4. Hitzebehandlung einer 0,13 n-Leucylglycinlösung bei 100°.

a) bei einem p_h von 6,93.

Das Dipeptid wurde in n/10-Lösung untersucht. Da der Körper jedoch nur in der 15fachen Menge heißen Wassers löslich ist[42]) und allzu heiße Lösungen in den van Slyke-Apparat nicht verbracht werden können, mußte ich besondere Vorsichtsmaßregeln ergreifen.

In diesem Falle hatte ich nur van Slyke-Zahlen zu ermitteln und den p_h zu kontrollieren.

Um jede van Slyke-Messung ohne allzu großen Substanzverbrauch der Kontrolle halber mehrmals durchführen zu können, verfuhr ich nach folgendem Schema:

Zu jeder Analyse entnahm ich der 0,13 n-Lösung, die konstant bei 100° der Hitzebehandlung unterworfen wurde, 15 ccm, spülte diese quantitativ in einem Meßkolben von 20 ccm und füllte dann mit Eisessig bis zur Marke auf, damit die Lösung auch nach dem Erkalten klar blieb. Um die 15 ccm aus der 0,13 n-Stammlösung herauszunehmen, mußte ich mich vorgewärmter Pipetten bedienen und darauf achten, daß nach

[42]) E. Fischer, Annalen: 1905, S. 142.

dem erfolgten Verkühlen auf die gleiche Temperatur immer in gleicher Zeit aufgesaugt wurde; diese Rücksicht war wegen der Volumenkontraktion unbedingt erforderlich. So erhielt ich stets 20 ccm n/10 Leucylglycin und verwandte davon pro Messung 5 ccm.

Vierzehn Tage hindurch erhitzte ich also eine 0,13 n-Lösung des Dipeptides auf dem siedenden Wasserbad unter Rückfluß und entnahm ihr nach Feststellung der Anfangszahlen jede Woche, also insgesamt zweimal, auf die soeben geschilderte Weise eine Probe zur Untersuchung.

Vor Beginn und nach Beendigung der Hitzebehandlung wurde eine elektrometrische p_h-Messung ausgeführt. Hierzu benutzte ich die wässrige 0,13 n-Lösung, die nach dem Abkühlen samt Bodenkörper in die Birnenelektrode gefüllt wurde.

Herstellung der 0,13 n-Leucylglycinlösung:

Unter Zusatz von 0,2 ccm n/1 NaOH löste ich 1,2156 g Leucylglycin in 50 ccm Wasser. Diese Lösung besaß die gewünschte Normalität von 0,13 und einen p_h von 6,93; sie war also nahezu neutral.

Die van Slyke-Zahl stieg nach siebentägiger Erhitzung um 1,27% und nach vierzehntägiger Hitzeeinwirkung um weitere 1,09%, mithin zusammen um 2,36% ihres ursprünglichen Wertes, an.

Ich stelle die gefundenen Werte wiederum tabellarisch zusammen:

Tabelle 20:

van Slyke-Zahlen einer bei p_h 6,93 auf 100° erhitzten 0,13 n-Lösung von Leucylglycin.

nach Tagen	van Slyke 5 ccm n/10	van Slyke-Anstieg	p_h in 0,13 n-Lösung
0	11,0 ccm N_2	—	6,93
7	11,14 ccm N_2	1.27%	—
14	11,26 ccm N_2	2,36%	6,94

Der kleine Anstieg der van Slyke-Zahlen zeigt, daß eine wesentliche Spaltung nicht stattgefunden hat. Die Wasserstoffionenkonzentration ist praktisch unverändert geblieben.

Die Totalhydrolyse hätte eine Verdoppelung der van Slyke-Zahl zur Folge gehabt. Man kann somit den geringen Anstieg als innerhalb der Fehlergrenze liegend betrachten.

b) bei einem p_h von 5,33.

Von dem Dipeptid machte ich mir wiederum eine 0,13 n-Lösung zurecht und verdünnte in der schon vorher bei der Erhitzung bei p_h 6,93 geübten Art zu jeder van Slyke-Bestimmung mit Eisessig auf n/10. Die p_h-Messung mit der Wasserstoffelektrode erfolgte, wie früher bereits, in der nicht weiter verdünnten 0,13 n-Stammlösung.

Zu diesem Zwecke wog ich 3,055 g Leucylglycin ein und löste dasselbe in 125 ccm Wasser. Elektrometrisch mittels strömenden Wasserstoffs fand ich den p_h der 0,13 n-Lösung zu 5,33.

Es wurde sodann wieder vierzehn Tage, ohne Unterbrechungen zu erleiden, auf konstant siedendem Wasserbad unter Rückfluß erhitzt.

Die Lösung ließ nach dieser Behandlung wiederum eine nur geringe Spaltung erkennen.

Der p_h war nach vierzehntägiger Erhitzungsdauer auf 5,19 gesunken. Nachfolgendes Schema erläutert die beobachteten Veränderungen am deutlichsten:

Tabelle 21.

van Slyke-Zahlen einer bei p_h 5,33 auf 100° erhitzten 0,13 n-Lösung von Leucylglycin.

nach Tagen	van Slyke 5 ccm n/10	vanSlyke-Anstieg	p_h in 0,13 n-Lösung
0	11,0 ccm N_2	—	5,33
7	11,2 ccm N_2	1,9%	—
14	11,41 ccm N_2	3,7%	5,19

Auch bringe ich, um den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Spaltung des Leucylglycins veranschaulichen zu können, ein Kurvenpaar (siehe Anhang Diagramm XIV), welches das Verhalten bei p_h 6,93 und p_h 5,33 zugleich erkennen läßt.

Eine vergleichende Betrachtung der Hitzeeinwirkung auf eine 0,13 n-Leucylglycinlösung bei den beiden gewählten p_h-Werten soll die folgende Zusammenstellung vermitteln:

Tabelle 22:

Anstieg der van Slyke-Zahlen von bei p_h 6,93 bezw. 5,33 auf 100° erhitzten 0,13 n-Leucylglycinlösungen.

p_h	van Slyke-Anstieg nach 7 Tagen	nach 14 Tagen
6,93	1,27%	2,36%
5,33	1,9 %	3,7 %

Die Spaltung geht bei p_h 5,33 ein wenig weiter als bei p_h 6,93; doch ist sie in beiden Fällen nur sehr gering. Man darf wohl sagen, daß das hier untersuchte Dipeptid unter den gewählten Bedingungen recht hitzebeständig ist.

5. Hitzebehandlung einer n/20-Lösung von Triglycyl-glycin bei 100°.

a) Bei einem p_h von 6,95.

Die n/20-Triglycyl-glycinlösung vom p_h 6,95 erhielt ich durch Lösen von 0,4 g Tetrapeptid in 32,5 ccm Wasser unter Zusatz von 0,07 ccm n/1 NaOH.

Die Erhitzung dieser Lösung ging unter den beim Dipeptid geübten analogen Bedingungen vor sich.

p_h-Messungen wie auch van Slyke-Bestimmungen wurden an der n/20-Lösung direkt vorgenommen.

Der van Slyke-Wert wurde nach siebentägiger Erhitzung um 1,5% und nach vierzehn Tagen nochmals um den gleichen Betrag höher als zu Beginn gefunden; seine gesamte Steigerung betrug mithin 3%. Ich gebe jetzt die gemessenen Werte:

Tabelle 23:

van Slyke-Zahlen einer bei p_h 6,95 auf 100° erhitzten n/20-Triglycyl-glycinlösung.

nach Tagen	van Slyke 3 ccm n/20	van Slyke-Anstieg	p_h in n/20-Lösung
0	3,30 ccm N_2	—	6,95
7	3,35 ccm N_2	1,5%	—
14	3,40 ccm N_2	3,0%	6,98

Der eingetretene Abbau ist jedenfalls sehr gering. Der p_h-Wert zeigt praktisch keine bedeutsame Veränderung. Den

Vergleich mit dem Verhalten des bei p_h 6,93 analog behandelten Leucylglycins bietet:

Tabelle 24:

Anstieg der van Slyke-Zahlen einer bei p_h 6,93 auf 100° erhitzten 0,13 n-Leucylglycinlösung und einer bei p_h 6,95 gleich hoch erhitzten n/20-Triglycylglycinlösung.

Substanz	van Slyke-Anstieg nach 7 Tagen	van Slyke-Anstieg nach 14 Tagen
Leucylglycin	1,27%	2,36%
Triglycylglycin	1,5 %	3,0 %

Die Unterschiede in der Zunahme der van Slyke-Zahlen sind verschwindend gering, sodaß eine durch die Länge der Peptidkette bedingte Resistenz gegen die Hitzebehandlung nicht angenommen werden kann.

b) Bei einem p_h von 5,39.

Genau wie vorher zum Zwecke der Untersuchung bei nahezu neutraler Reaktion (p_h 6,95), löste ich 0,4 g Triglycylglycin in 32,5 ccm Wasser und hatte so eine Lösung, die, abgesehen vom p_h, der jüngst verwendeten vollkommen glich. Sie war 1/20 normal und hatte einen p_h von 5,39. Diese Lösung besaß fast genau isoelektrische Reaktion; denn der isoelektrische Punkt des Triglycyl-glycins liegt bei einem p_h-Wert von 5,40[43]). Auf dem siedenden Wasserbad wurde sie unter Rückfluß erhitzt. Die durch Messung ermittelten Werte enthält:

Tabelle 25:

van Slyke-Zahlen einer bei p_h 5,39 auf 100° erhitzten n/20-Triglycyl-glycinlösung.

nach Tagen	van Slyke 3 ccm n/20	van Slyke-Zuwachs	p_h in n/20-Lösung
0	3,30 ccm N_2	—	5,39
7	3,36 ccm N_2	1,8%	—
14	3,43 ccm N_2	3,9%	5,44

[43]) E. Stiasny & H. Scotti, Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft 1930, S. 2977.

Der verhältnismäßig unwesentliche Anstieg des p_h rührt wahrscheinlich von einem während der Erhitzung eingetretenen Entweichen der im Wasser gelösten Kohlensäure her und kann wohl vernachlässigt werden.

Der Zuwachs der van Slyke-Zahl ist unverkennbar, aber dennoch in mäßigen Grenzen.

Auch hier soll ein die Spaltung bei p_h 6,95 wie bei p_h 5,39 darstellendes Kurvenpaar die gefundenen Ergebnisse anschaulich machen.

Diese Darstellung (siehe Anhang Diagramm XV) zeigt, daß bei p_h 5,39 etwas mehr Peptidbindungen gelöst werden, als es bei nahezu neutraler Reaktion zu beobachten ist. Die isoelektrische Reaktion scheint also auf die hydrolytische Spaltung keinen maßgeblichen Einfluß auszuüben.

Noch eindringlicher zeigt dies:

Tabelle 26:

Anstieg der van Slyke-Zahlen einer bei p_h 6,95 und bei p_h 5,39 auf 100° erhitzten n/20 Lösung von Triglycyl-glycin.

p_h	van Slyke-Anstieg	
	nach 7 Tagen	nach 14 Tagen
6,95	1 %	3 %
5,39	1,8%	3,9%

Die Spaltung in der unmittelbaren Nachbarschaft des isoelektrischen Punktes übertrifft den am Neutralpunkt beobachteten Abbau, wie ersichtlich, sogar um ein weniges. Die Hydrolyse ist aber in beiden Fällen eine lediglich geringfügige.

Man darf nicht vergessen zu beachten, daß eine Totalhydrolyse des Tetrapeptides sich durch einen 300%igen Anstieg der van Slyke-Werte ausgewirkt hätte, sodaß doch tatsächlich nur von minimalsten Abbauerscheinungen in unserem Falle die Rede sein kann.

Aber auch ein Vergleich der bei fast gleichen p_h-Werten erhitzten Lösungen des Dipeptides und des Tetrapeptides, der schon für das Beispiel einer in der Nähe des Neutralpunktes gelegenen Wasserstoffionenkonzentration praktisch gleiche Resistenz beider Peptide anzeigte, ist hier wieder besonders instruktiv. Daher sind die entsprechenden Meßbefunde an dieser Stelle auch für im sauren Gebiet gelegene p_h-Werte nochmals zusammengestellt (Tabelle 27).

Tabelle 27:

Anstieg der van Slyke-Zahlen einer bei p_h 5,33 auf 100° erhitzten 0,13 n-Leucylglycinlösung und einer bei p_h 5,39 gleich hoch erhitzten n/20-Lösung von Triglycyl-glycin.

Substanz	van Slyke-Anstieg	
	nach 7 Tagen	nach 14 Tagen
Leucyl-glycin	1,9%	3,7%
Triglycyl-glycin	1,8%	3,9%

Ein Unterschied in der Resistenz, der von der Länge der Peptidkette herrührt, kann also nicht festgestellt werden.

B. Qualitative Untersuchungen.

1. Fluoreszenzerscheinungen im filtrierten Ultraviolettlicht.

a) An unvorbehandeltem und an desaggregiertem Eialbumin.

Als Ergänzung der quantitativen Ergebnisse, die sich auf die genaue Verfolgung der Viskosität, der Lösung von Peptidbindungen und des p_h bezogen, unternahm ich noch einige qualitative Untersuchungen.

Da man bei Gelatine vor einiger Zeit eine mit der fortschreitenden Desaggregierung einhergehende Zunahme der Fluoreszenz unter dem filtrierten Licht der Quarzlampe beobachtet hatte[44]), lag es nahe, auch Casein und Ovalbumin diesbezüglich zu untersuchen.

Es war nämlich zu vermuten, daß die Zunahme der Eigenfluoreszenz vielleicht im Zusammenhang mit einer Lockerung von Partialvalenzen stehen könnte.

Diese Untersuchungen führte ich in der Weise aus, daß ich einen Teil der gleichen Ovalbuminlösung, die ich bei p_h 6,9 thermisch desaggregierte, in Jenaer Glasröhren eingeschmolzen, zur Beobachtung brachte. Ich durfte annehmen, daß mit Fortschreiten der Desaggregierung eventuell eine zu beobachtende Aenderung in der Farbe oder Intensität der Eigenfluoreszenz festzustellen wäre.

---

[44]) H. Pringsheim und O. Gerngross, Ber. d. Dtsch. Chem. Ges. 61; 2009 (1925).

Zur Fluoreszenzmessung wurden nun drei Jenenser Glasröhren genommen, die gleiche Farbe und gleiches Kaliber besaßen, und mit Wasserdampf wegen der unerläßlichen Sterilität sehr gut ausgekocht. Die Röhren wurden mit je 10 ccm der 9%igen Ovalbuminlösung von p_h 6,9 gefüllt und sofort zugeschmolzen. Zwei Röhren wurden bei 50° in den Thermostaten gestellt, um nach achttägiger bezw. fünfzehntägiger Hitzeeinwirkung im filtrierten Ultraviolettlicht untersucht zu werden, während ein Röhrchen als Vergleichsobjekt zurückblieb.

Die unbehandelte Albuminlösung zeigte unter den Strahlen der Quarzlampe eine deutlich hellblaue Fluoreszenz, während das verwendete Glas nicht fluoreszierte.

Nun waren die in den Thermostaten zwecks Fluoreszenzmessung eingestellten Lösungen nach achttägigem Erhitzen aber ausgeflockt. So blieb mir, um eine Vergleichsbasis zu schaffen, nichts anderes übrig, als die ursprüngliche Probe bei 70° zu koagulieren. Dies bewirkte ich, um eine Desaggregierung sorgsam zu vermeiden, indem ich im schrittweise geheitzten Wasserbad im Laufe einer Stunde allmählich auf eine Temperatur von 70° erwärmte. Das Ovalbumin zeigte nach erfolgter Koagulation ebenfalls deutliche Fluoreszenz, jedoch von weißer Farbe, von einem bläulichen Schein durchzogen. So besaß ich eine einwandfreie Vergleichsmöglichkeit und untersuchte das Eialbumin in koaguliertem Zustande. Das Resultat gebe ich in folgender Tabelle wieder:

Tabelle 28:

Fluoreszenzerscheinungen im filtrierten Ultraviolettlicht an unbehandeltem und bei 50° erhitztem koaguliertem 9%igen Eialbumin (p_h = 6,9).

nach Tagen	Farbe	Intensität
0	weiß (bläulicher Schein)	deutlich
8	bläulich	helleuchtend
15	blau	stark leuchtend

Die früher mitgeteilten hierher gehörigen van Slyke-Werte lassen beispielsweise nach achttägiger Erhitzung noch keinen

Zuwachs erkennen. Zur gleichen Zeit aber ist bei der im filtrierten Ultraviolettlicht beobachteten Fluoreszenz ein unleugbarer erheblicher Anstieg in Bezug sowohl auf die Farbe als auch auf die Intensität festzustellen. Die Eigenfärbung der Albuminlösung zeigt nach achttägiger Erhitzung eine ganz minimale Vertiefung.

Daraus geht hervor, daß zu einer Zeit, wo eine Lösung von Peptidbindungen überhaupt noch nicht eingesetzt hat, schon eine sehr auffällige Aenderung der Eigenfluoreszenz zu konstatieren ist.

b) An unvorbehandelter und an desaggregierter Caseinlösung.

Diese Versuche führte ich mit einer 15%igen Caseinlösung vom p_h 6,74 durch, welche bei 50° im Thermostaten gehalten wurde und auch während des Fortschreitens der Thermolyse praktisch ungetrübt blieb. Doch trat eine leichte Bräunung auf, und nach längerer Zeit gelatinierte das fünfzehn Tage lang erwärmte Sol.

Alle Glasröhren, in die ich die drei Proben der Lösung einschloß, besaßen, wie auch beim Eialbumin, untereinander gleiche Farbe, keine Eigenfluoreszenz und waren kalibriert.

Bei fortschreitender Desaggregierung blieb die Intensität der Fluoreszenz konstant, in ihrer Farbe kam deutliche Aufhellung zum Vorschein. Die hierbei auftretenden Erscheinungen gelangen in folgender Uebersicht zur Wiedergabe:

Tabelle 29:

Fluoreszenzerscheinungen im filtrierten Ultraviolettlicht von unbehandelter und von auf 50° erhitzter 15%iger Caseinlösung (p_h = 6,74).

nach Tagen	Farbe	Itensität
0	bläulich (leicht violetter Schein)	stark leuchtend
8	heller als zu Beginn	unverändert
15	noch heller geworden	unverändert

Hier liegt, im Gegensatz zu den beim Ovalbumin gemachten Feststellungen, eine Abnahme der Fluoreszenz vor. Es ist aber zu bedenken, daß beim Ovalbumin durch Hitze-

behandlung nur wenige Peptidbindungen gelöst wurden, während beim Casein, wie erinnerlich, nach dem dritten Tage der Erhitzung ein gewaltiger Abbau einsetzte.

Zuvor war auch von anderer Seite[45]) beobachtet worden, daß unvorbehandelte Gelatine keine deutliche Fluoreszenz aufweist, Gelatinehydrolysat fluoresziert und eine hitzebehandelte Gelatinelösung die intensivsten Fluoreszenzerscheinungen zeigt.

Deshalb ist anzunehmen, daß die Entstehung kleinerer desaggregierter Moleküle den Anstieg der Fluoreszenz hervorruft, und das Verhalten der Caseinlösung findet unter diesem Gesichtspunkt seine Erklärung.

2. Reaggregierung von Gelatine.

Es war ferner interessant zu untersuchen, ob nach dem Erkalten einer desaggregierten Gelatinelösung eine Reaggregierung stattfindet oder nicht.

Falls dies zutreffen sollte, war vorauszusehen, daß eine desaggregierte Gelatine, die lange Zeit bei niederer Temperatur gelagert hatte, besonders eindrucksvoll ein darauf hinweisendes Verhalten an den Tag legen müßte.

E. Sauer[46]) machte z. B. die Beobachtung, daß frisch bereitete Leimbrühen geringere Viskosität besitzen, als analoge Lösungen von Leimtafeln, die längere Zeit nach der Herstellung gelegen hatten. Zum Zwecke der Durchführung dieser interessanten Versuche entnahm ich der untersuchten isoelektrischen 25%igen Gelatinelösung, als sie nach 33 tägiger Hitzebehandlung bei 70° eine Viskosität von 1,25 bei 30° und von 1,22 bei 40° besaß, eine kleine Probe, die ich vier Monate hindurch bei etwa 0° aufbewahrte. Nach Ablauf dieser Zeit betrug die Viskosität bei 30° 1,30 und bei 40° 1,24. Die Viskosität war jedesmal mit 25 ccm der auf 3% verdünnten 25%igen Ausgangslösung gemessen worden.

Eine andere Gelatinelösung, die bei p_h 6,8 und 75° desaggregiert worden war und am Ende der 26 tägigen Erhitzung eine Viskosität von 1,33 bezw. 1,29 besaß, zeigte nach derselben Lagerzeit eine Viskosität von 1,36 bezw. 1,32.

[45]) O. Graf Triangi, Dissertation Technische Hochschule Berlin, 1929; S. 65.

[46]) E. Sauer, Chemiker-Zeitung 48; 501 (1924).

Eine dritte Gelatinelösung wurde bei ebenfalls 75° und p_h 7,9 sechs Tage lang desaggregiert. Ihre Viskosität betrug damals 1,59 bezw. 1,48. Nach vier Monaten Lagerzeigt zeigte die sonst unveränderte Lösung Viskositäten von 1,60 bezw. 1,50.

In folgender Tabelle sind diese Daten nochmals zusammengestellt:

Tabelle 30:

Reaggregierung von thermisch desaggregierter Gelatine nach 4-monatlichem Lagern, gemessen an ihrer Viskosität.

Vorbehandlung der Galantinelösuug	Viskosität			
	sofort		nach Lagern	
	30°	40°	30°	40
6 Tage (p_h 7,9)	1,58	1,48	1,60	1,50
26 Tage (p_h 6,8)	1,33	1,29	1,36	1,33
33 Tage (p_h 5)	1,25	1,22	1,30	1,24

Die Tabelle zeigt deutlich, daß desaggregierte Gelatinelösungen nach viermonatlichem Lagern wiederum viskoser werden; ebenso, wie der frühere Abfall der Viskosität ein Kennzeichen ihrer Desaggregierung war, ist der spätere Anstieg derselben ein wichtiges Merkmal einer Molekülvergrößerung, einer Reaggregierung. Diese Reaggregierung ist zwar ihrem algebraischen Ausmaß nach nur unbedeutend, sie zeigt aber andererseits, daß die Desaggregierung kein völlig irreversibler Prozeß ist.

An der teilweisen Reversibilität des Desaggregierungsvorganges ist, wie auch schon von anderer Seite[47]) [48]) aufgezeigt wurde, wohl kaum noch zu zweifeln.

3. Gerbfähigkeit von intakter und von desaggregierter Gelatine.

Es ist bekannt, daß Gelatine durch Behandlung mit Formalin gegerbt wird. Diese Gerbung erzeugt Unlöslichkeit in Wasser, die selbst durch langes Kochen nicht aufgehoben wird.

[47]) O. Graf Triangi, Dissertation Techn. Hochsch. Berlin 1929; Seite 91.

[48]) H. Maier-Bode, Kunstdünger und Leim 26; 339 (1929).

Um nun zu untersuchen, ob die thermische Desaggregierung einen Einfluß auf die Formalingerbung besitzt, stellte ich mir drei Gelatinepräparate in folgender Weise her:

Eine 8 Tage und eine 14 Tage lang auf dem siedenden Wasserbad bei isoelektrischer Reaktion erhitzte 25%ige Gelatinelösung waren eingedampft und ihre zurückbleibenden Desaggregate sorgfältigst gepulvert worden. Die Desaggregate waren in Wasser ohne Quellungserscheinungen leicht bei Zimmertemperatur löslich. Außerdem benutzte ich ein gut getrocknetes intaktes Gelatinepulver.

Von allen drei Präparaten stellte ich 15%ige Lösungen her, die nach erfolgter Neutralisation gegen Lackmus ganz schwach alkalisch reagierten und einen p_h von 7 besaßen. Von jedem Präparat wurden 0,5 g in 2,8 g Wasser gelöst und sodann in Messingkästchen von nahezu gleicher Fläche gefüllt. Nach mehrtägigem Stehen waren die Lösungen getrocknet, und es war nun leicht, die zu untersuchenden Präparate in Form fast gleich dicker Filme herauszuschneiden. In dieser Gestalt gab ich jedes Präparat in ein gesondertes Reagenzglas und überschichtete sie einzeln mit der je zehnfachen Menge Formalin. Um Nebenreaktionen von vornherein auszuschließen, hatte ich mir zu diesem Zwecke eine 5%ige, gegen Phenolphtalein neutralisierte Lösung von Formaldehyd bereitet.

Ich ließ jetzt die mit der angegebenen Formalinlösung überschichteten Filme zwei Tage lang bei Zimmertemperatur stehen. Nach Ablauf dieser Frist zeigte sich, daß das achttägige Desaggregat zum weitaus größten Teile und das vierzehntägige desaggregierte Präparat vollständig in Lösung gegangen war. Nur der aus der intakten Gelatine erzeugte Film ließ eine bedeutende Unlöslichkeit erkennen.

Nunmehr begann ich zum Sieden zu erhitzen, da ja in derartigen Fällen die Kochprobe von ausschlaggebender Bedeutung ist. Das vierzehn Tage desaggregierte Material war ja ohnehin schon gänzlich in Lösung gegangen und konnte hierbei also sofort ausscheiden. Die aus dem achttägigen Desaggregat hergestellte Probe löste sich beim Kochen momentan auf. Nur das keiner Vorbehandlung unterworfene Präparat ging n i c h t in Lösung. Es hatte eine charakteristische grünliche Verfärbung erlitten. Selbst bei eine Viertelstunde währendem, anhaltenden Sieden blieb dieser Film

ungelöst, wodurch einwandfrei dokumentiert wurde, daß er eine Formalingerbung erfahren hatte.

Man ersieht aus diesen Befunden ohne weiteres, daß unvorbehandelte Gelatine durch Formaldehydbehandlung in bekannter Weise einer Gerbung unterliegt. Zugleich erkennt man aber auch, daß durch thermische Vorbehandlung, selbst wenn keine wesentlichen Anzeichen für einen hauptvalenzchemischen Abbau gegeben sind, die Gelatine eine tiefgreifende Veränderung durchmacht, durch welche sie ihrer Gerbfähigkeit verlustig geht.

4. Extraktion von Gelatinedesaggregat mit Essigester.

Schließlich sollte das Wagnis unternommen werden, einen durch die thermische Desaggregierung vielleicht befreiten, mit Hilfe von Röntgenspektrographien[49]) ermittelten kristallinen Elementarkörper des Glutins abzufangen.

Die Kristallinterferenzen werden aber durch Hitzebehandlung schwächer[50]), ebenso wie eine Ablösung der durch Nebenvalenzen bewirkten Querverbindungen in den Mizellen hierbei sich geltend macht. Ein so weitgehend „zerfranstes" Mizell macht eine Kristallinität recht unwahrscheinlich.

Nach den im theoretischen Teil zitierten Vorstellungen von Meyer und Mark sowie von Gerngroß und Herrmann, wohl auch von Sörensen, besteht wenig Aussicht, den kristallinen Bestandteil der Gelatine zu isolieren, da sehr hochmolekulare Gemische einzelner Komponenten vorliegen müssen.

Trotzdem wurde, auch mit Rücksicht auf die alte Diketopiperazin-Aggregierungstheorie, ein dahingehender Versuch unternommen.

Also führte ich mit Essigester — wegen seines guten Lösungsvermögens für Diketopiperazine[51]) — an einer acht

---

[49]) O. Gerngross und J. R. Katz, Naturwissenschaften 13; 900 (1925).
dieselben, Kolloid-Zeitschrift 39; 182 (1926).

[50]) O. Gerngross, O. Graf Triangi und P. Köppe, Ber. Dtsch. chem. Ges. 63; 1606 (1930).

[51]) E. Abderhalden und Kasimir Funk, Ztschr. f. physiolog. Chem. 53; 19 (1907).

Tage und einer vierzehn Tage lang bei 100° und isoelektrischer Reaktion desaggregierten Gelatine Extraktionen aus.

Das aus den Desaggregaten erhaltene Pulver wurde in einer Platinschale bei 100° getrocknet, in Achatmörser sehr fein zerrieben und einen Tag über bei 105° restlos entwässert. Für die Extraktion mit Essigester, der mit entwässertem Kupfersulfat auf absolute Wasserfreiheit geprüft war, wählte ich folgende Apparatur:

Ein Erlenmeyer-Kolben von 250 ccm wurde mit 50 ccm Essigester gefüllt und mit einem gut passenden, zwei Oeffnungen tragenden Bleideckel geschlossen. Durch eine Deckelöffnung ging ein kurzes Bleirohr, das unterhalb des Deckels spiralig weiterlief, eine vertikale Schlinge beschrieb und dann gerade die andere Oeffnung des Deckels verließ. Zwei unter dem Deckel beiderseitig befindliche Bleihaken ließen sich in die Oeffnungen eines kleinen Soxhlet-Gefäßes klemmen, sodaß der Soxhletapparat, in welchen ich die zu extrahierende Substanz, in Extraktionshülsen aus Filtrierpapier gefüllt, eintrug, ohne Berührung mit dem Essigester im Kolben hängen konnte.

Dieser Kolben kam auf ein angeheiztes Sandbad, und ein permanenter Waserstrom wurde durch die Bleispirale geleitet. Das Extraktionsmittel geriet allmählich ins Sieden, kondensierte sich am Bleischlangenkühler und tropfte in das Soxhletgefäß hinein.

Die einfache Apparatur gestattet im Gegensatz zu anderen, die Extraktion bei der Siedetemperatur der Extraktionsflüssigkeit vorzunehmen.

Einwage an 8 tägigem Desaggregat: 5,0664 g
Einwage an 14 tägigem Desaggregat: 5,1237 g.

Nach fünfzehnstündiger Extraktion erhielt ich in beiden Fällen einen farblosen Extrakt.

Sodann extrahierte ich andere Mengen längere Zeit hindurch:

Einwage an 8 tägigem Desaggregat: 5,0664 g
Einwage an 14 tägigem Desaggregat: 4,4240 g.

Während der Extraktion war eine minimale Gelbfärbung der Extraktionsflüssigkeit zu beobachten. Nach 112 stündiger Dauer erhielt ich schwach gelb gefärbte Extrakte. Die in den Hülsen verbliebene, extrahierte Gelatine war dunkler geworden und zusammengebacken.

Aus dem nach fünfzehn Stunden aus dem 8 tägigem Desaggregat erhaltenen Extrakt konnte nach dem Eindampfen im Vakuum nur eine ganz geringe Menge eines stark gelb gefärbten Oeles erhalten werden, welches sich in Alkohol leicht löste.

Der nach gleicher Extraktionsdauer aus dem 14 tägigen Desaggregat gewonnene Extrakt hinterließ nach dem Eindampfen im Vakuum ebenfalls Spuren eines gelben Oeles. Doch war dieses Oel nicht in Alkohol löslich; nach 10 tägigem Stehen bei Zimmertemperatur hatte es amorphen Charakter angenommen und schwamm dann in Alkohol-Wasser-Gemischen in öliger Suspension. Unter stark vermindertem Druck eingedampft, hinterließ diese Suspension eine winzige Menge einer farblosen amorphen Substanz, die ebenfalls nicht wasserlöslich ist.

Der nach 112 Stunden aus der acht Tage hindurch bei 100° thermisch desaggregierten Gelatine gewonnene Extrakt, der schwach gelbe Farbe besaß, ergab, nachdem der Essigester verdunstet war, eine ungefärbte Substanz, die als kristallin erkannt werden konnte.

Der unter analogen Bedingungen aus dem 14 tägigen Desaggregat erzielte Extrakt ließ nach dem Eindampfen im Vakuum eine sehr kleine Menge einer kristallinen Substanz zurück. Jedoch war leider auch hier die Menge des gewonnenen Körpers derartig gering, daß es nicht möglich war, auch nur die einfachsten weiteren Untersuchungen mit ihm anzustellen.

Um nun zu prüfen, ob die Extraktion der angewandten Desaggregate schon erschöpft wäre, wurden dieselben Präparate erneut mit Essigester ausgezogen.

Nach 30 stündiger Extraktion war an dem 14 Tage desaggregierten Material kein Erfolg wahrzunehmen. Der Essigester war vollkommen farblos, sodaß nicht zu hoffen war, weitere Mengen einer in dem Ester löslichen Kittsubstanz zu erhalten. Die Extraktion war in diesem Falle sicherlich erschöpft, wie ihre Ausbeute auch immerhin ausgefallen war. Daher wurden an diesem Desaggregat weitere Versuche in dieser Richtung nicht unternommen. Der Extrakt wurde zwar noch im Vakuum eingedampft, hinterließ aber nur eine hauchdünne Spur, die naturgemäß genaueren Erhebungen nicht zugänglich war.

Nach ebenfalls dreißig Stunden hatte sich der aus dem achttägigen Desaggregat stammende Extrakt deutlich gelb gefärbt. Er wurde, wie üblich, eingeengt. Als eine kleine Portion herauskam, wurde das Eindampfen sogleich unterbrochen. Es blieb ein Rückstand, der in starkem Maße hygroskopisch war. Er war jedoch so gering, daß sich Bemühungen, zu einer Aufklärung seiner Natur zu gelangen, von selbst ausschlossen.

Wie zu ersehen ist, waren die Versuche, zur Isolierung des kristallinen Bestandteils des Glutins zu gelangen, leider resultatlos. Es konnten lediglich Spuren kristalliner Abscheidung beobachtet werden, aus denen Folgerungen sich nicht ziehen lassen.

C. Zusammenfassung und Ergebnisse.

1. Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Untersuchung der Aenderungen, welche Lösungen von Eiweißkörpern und Peptiden durch Hitzebehandlung bei verschiedenen Temperaturen, p_h-Werten und nach verschieden langer Zeitdauer der Erhitzung erfahren. Es sollte festgestellt werden, wie die physikalischen Eigenschaften bei den Proteinen sich hierbei verändern, und ob und in welchem Ausmaß ein Hauptvalenzabbau erkennbar wäre. Dadurch sollte ein Beitrag zur Aufklärung des mizellaren Baues der Proteine gewonnen werden.

Beispielsweise mußte ein Abfall der Viskosität der Proteinlösungen ohne erkennbaren Peptidabbau für einen lediglich aggregierenden Zusammenschluß der Hauptvalenz-(Polypeptid)-Ketten durch übermolekulare Kräfte im mizellaren Verband sprechen.

Die Prüfung, ob Polypeptidlösungen an sich bei der gleichen thermischen Behandlung, wie sie an den Proteinen durchgeführt wurde, unter Lösung von Peptidbindungen gespalten werden, sollte darüber Aufschluß geben, ob ein Hauptvalenzabbau überhaupt bei der Thermolyse der Proteine wahrscheinlich oder möglich sei.

2. Diese Untersuchungen wurden durchgeführt an:

a) Elektroosmotisch gereinigter, fast aschefreier *Gelatine*, deren in 5%iger Lösung gemessener p_h-Wert von 5,00 außerdem weitgehende Reinheit verbürgte.
b) *Hammarsten Casein* von Merck.
c) *Ovalbumin* von Schering; in Lamellen.
d) *Leucylglycin*, das von mir synthetisch gewonnen und durch den Schmelzpunkt der Literatur (243° korrigiert) sowie durch Analyse auf Reinheit kontrolliert war.
e) *Triglycyl-glycin*, das gleichfalls von mir synthetisch hergestellt und durch Analyse auf Reinheit geprüft wurde.

3. Die p_h-Messungen wurden elektrometrisch mittels strömenden Wasserstoffs durchgeführt. Es zeigte sich, daß — im

Gegensatz zu nicht desaggregierter Gelatine — thermisch desaggregierte Gelatinelösungen häufig infolge mangelnder Potentialkonstanz nicht potentiometrisch meßbar waren; in diesen Fällen erfolgte eine kolorimetrische p_h-Bestimmung mit Hilfe des Hellige-Komparators.

4. Die Viskosität wurde im Ostwald-Vikosimeter mit stets 25 ccm Lösung bei 30° und 40° gemessen.

5. Die quantitative Ueberprüfung des Hauptvalenzabbaues bestand in der volumetrischen Bestimmung des Aminosäurestickstoffs nach van Slyke, da sich diese Methode als überragend genau im Vergleich zu den anderen erwies, und hin und wieder auch in der alkalimetrischen Bestimmung der Peptide und Aminosäuren nach R. Willstätter und E. Waldschmidt-Leitz.

6. Die quantitativen chemischen Untersuchungen ergaben bei der Hitzebehandlung folgendes:

a) 25%ige Gelatinelösungen:

bei einem p_h-Wert von 6,1 und einer Erhitzungstemperatur von 75° waren die van Slyke-Zahlen nach fünfzehntägiger Hitzebehandlung konstant geblieben, obwohl die Viskosität bei 30° bereits auf 8,18% ihres Anfangswertes gesunken, also fast vollkommen verschwunden war.

Eine den gleichen Bedingungen unterworfene Lösung vom p_h 8,3 zeigte nach ebenfalls fünfzehntägiger Thermolyse einen Abfall der bei 30° gemessenen Viskosität auf 16,6% des ursprünglichen Betrages, während der Anstieg der van Slyke-Zahl 5,4% ausmachte.

Gleichfalls nach fünfzehntägiger Erhitzungsdauer bei derselben Temperatur konnte an einer Gelatinelösung von praktisch isoelektrischer Reaktion (p_h 5,00) ein Absinken der Viskosität bei 30° auf 24,6% und eine Steigerung der van Slyke-Werte um 5,4% beobachtet werden.

Eine gleich lange bei 50° und p_h 4,3 desaggregierte Gelatinelösung ließ einen Viskositätsabfall auf 52,6% des bei 30° anfangs gemessenen Wertes erkennen, aber die van Slyke-Zahl war hier um 18,1% gestiegen. Der Anstieg der van Slyke-Zahl, der auch an anderen Gelatinelösungen im Verlaufe einer allerdings bedeutend längeren Hitzeeinwirkung mitunter auftrat, ist hier sehr auffallend und offenbar durch

eine bei p_h 4,3 bereits einsetzende echte Hydrolyse zu erklären.

Diese Versuche zeigen somit, daß bei p_h 6,1 — also nahe der Neutralität — selbst nach fünfzehntägigem Erhitzen auf 75° ein Hauptvalenzabbau überhaupt nicht stattfindet, obwohl die Viskosität auf Bruchteile des ursprünglichen Wertes gesunken ist. Der Viskositätsabfall ist also durch reine Desaggregierung veranlaßt.

Im übrigen scheint die Variation der p_h-Werte zu ergeben, daß zwischen dem Anstieg der van Slyke-Zahlen und dem Viskositätsabfall — unter den von mir gewählten Bedingungen — keine unmittelbare Beziehung besteht.

b) 9%ige Ovalbuminlösung:

Bei einem p_h-Wert von 6,9 und einer Erhitzungstemperatur von 50° zeigten Viskosität und van Slyke-Zahlen nach sechstägiger Hitzebehandlung noch keine Veränderung.

Es ergibt sich somit, daß bei Ovalbumin innerhalb von sechs Tagen, im Gegensatz zu Gelatine, eine Desaggregierung nicht stattfindet. Eine echte Hydrolyse ist auch nicht festzustellen. Dieser Befund könnte als eine Stütze für die Sörensensche Hypothese angenommen werden, daß das Eialbumin tatsächlich eine Sonderstellung unter den Proteinen einnimmt, indem es mit seinem Molekulargewicht von 35 000 einen nicht desaggregierbaren Grundtyp darstellt.

Nach fünfzehntägiger Hitzebehandlung war die van Slyke-Zahl um 9,4% gegenüber ihrem Anfangswert erhöht, die Viskosität aber nicht gefallen, sondern sogar um 57,9% gestiegen. Zugleich trat eine ultramikroskopische Trübung, aber keine Flockung auf. Sie ist wohl die Ursache des Viskositätsanstiegs; eine Hitzekongulation ist bei 50° als sehr unwahrscheinlich zu betrachten.

Man sieht also, daß die fünfzehntägige Hitzebehandlung des Eialbumins bei p_h 6,9 und 50° eine geringe Hydrolyse hervorruft; doch sind diese länger ausgedehnten, unter Viskositäts a n s t i e g verlaufenden Versuche nicht ganz klar.

c) 15%ige Caseinlösung:

Nach dreitägiger Thermolyse bei p_h 6,74 und 50° betrug die bei 30° gemessene Viskosität nur noch 46,5% ihres An-

fangswertes. Die van Slyke-Zahl war zur gleichen Zeit noch ihrem ursprünglichen Betrage gleich.

Ein bei weiterer Hitzebehandlung eintretender, stark ansteigender Zuwachs der van Slyke-Werte legte die Vermutung einer bakteriellen Zersetzung nahe. Daher konnten die hernach ermittelten Daten, welche also als unsicher zu bezeichnen sind, nicht berücksichtigt werden.

Aus diesem dreitägigen Versuch läßt sich mithin die Folgerung ziehen, daß eine deutliche Desaggregierung eingetreten ist und trotzdem kein Peptidabbau sich zu erkennen gibt.

d) 0,13 n-Leucylglycinlösung:

Bei p_h 6,93 und einer Temperatur von 100° hatte nach sieben Tagen die van Slyke-Zahl um 1,27% und nach vierzehn Tagen um 2,36% zugenommen. Bei derselben Temperatur und p_h 5,33 betrug ihr Zuwachs nach sieben Tagen 1,9% und nach vierzehntägiger Erhitzung 3,7%.

Man kann somit feststellen, daß praktisch eine Peptidspaltung nicht stattgefunden hat.

e) n/20 Triglycyl-glycinlösung:

Unter der Einwirkung einer in Bezug auf Temperatur und Dauer dem vorhergehenden Dipeptid analogen Hitzebehandlung zeigte Triglycyl-glycin bei p_h 6,95 einen van Slyke-Zuwachs von 1,5% bezw. 3,0% und bei p_h 5,39 einen solchen von 1,8% bezw. 3,9%.

Es folgt unmittelbar, daß auch das Tetrapeptid eine hdrolytische Spaltung von Bedeutung nicht erlitten hat; und ein Vergleich der Ergebnisse zeigt, daß man der Länge der Kette einen Einfluß auf die Resistenz nicht einräumen kann. Somit ist es sehr unwahrscheinlich, daß bei der Thermolyse der Proteine der Peptidabbau eine irgendwie maßgebende Rolle spielt.

7. An 9%igem kosgulierten Eialbumin von p_h 6,9 wurde unter den filtrierten ultravioletten Strahlen der Quarzlampe eine mit der bei 50° vorgenommenen Hitzebehandlung einhergehende Zunahme der Farbe und Intensität der Eigenfluoreszenz festgestellt. Nach achttägiger Hitzebehandlung war der Fluoreszenzanstieg schwach, nach fünfzehn Tagen aber von auffälliger Stärke. Es würde dies mit dem Befund von H. Pringsheim und O. Gerngross übereinstimmen, daß

Teilchenzerkleinerung mit einer Fluoreszenzerhöhung einhergeht.

Die 15%ige Caseinlösung von p_H 6,74 ließ jedoch nach einer Erhitzung bei gleicher Temperatur und gleichen Zeiten eine mit der Dauer der Einwirkung fortschreitende Verringerung der Fluoreszenz im filtrierten Ultraviolettlicht erkennen.

8. An dem langsamen Anstieg der Viskosität, der nach vier Monate langer Lagerzeit an zuvor thermisch abgebauten 25%igen Gelatinelösungen zu beobachten war, konnte eine Reaggregierung erkannt werden. Isoelektrische Gelatine zeigte die relativ stärkste Reaggregierung, dann folgte eine fast neutrale Lösung, während das schwach alkalische Desaggregat den geringsten Viskositätsanstieg wahrnehmen ließ.

9. Ein weiteres Kennzeichen für die Desaggregierung der Gelatine wurde in ihrem Verlust der Gerbfähigkeit gefunden. Es ließ sich zeigen, daß Gelatinedesaggregat sich in Formalin wie in reinem Wasser löst, während intakte Gelatine der bekannten Formaldehydgerbung anheimfällt.

10. Endlich wurden an einer acht Tage sowie vierzehn Tage bei 100° und isoelektrischer Reaktion desaggregierten Gelatine Extraktionen mit Essigester durchgeführt. Es konnten jedoch nur Spuren einer farblosen kristallinen Substanz gewonnen werden, sodaß es unmöglich war, hieraus irgendwelche Schlußfolgerungen zu ziehen.

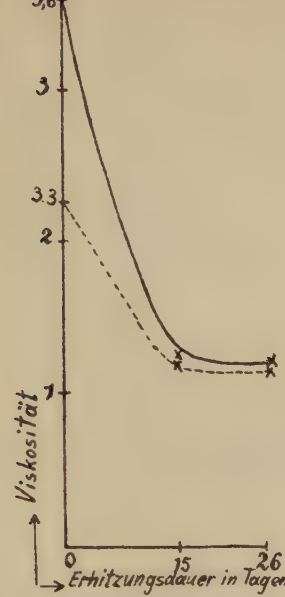


Diagramm II.

Vikositätsänderung beim Erhitzen einer Gelatinelösung von P_h 6,1 auf 75°.

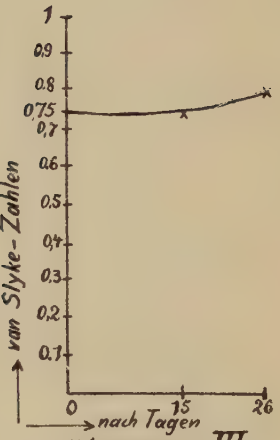


Diagramm III.

Anstieg der van Slyke-Zahlen beim Erhitzen einer Gelantinelösung von p_h 6,1 auf 75°

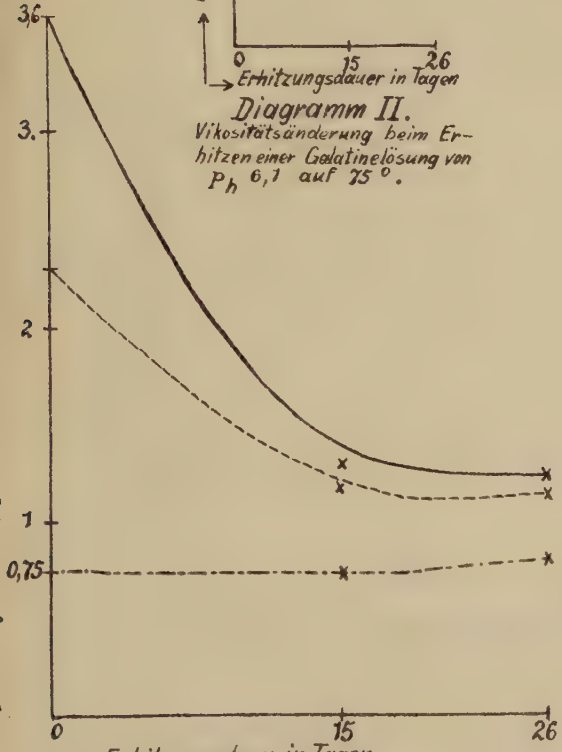


Diagramm IV.

Viskositätsänderung und Anstieg der van Slyke-Zahlen beim Erhitzen einer Gelantinelösung von p_h 6,1 auf 75°

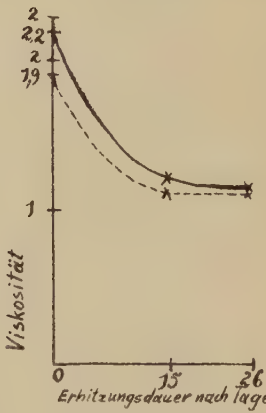


Diagramm V.

Viskositätsänderung einer bei P_h 8,3 auf 75° erhitzten 25%igen Gelantinelösung

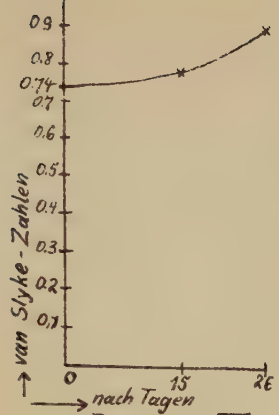


Diagramm VI.

Anstieg der van Slyke-Zahlen einer bei P_h 8.3 auf 75° erhitzten 25%igen Gelatinelösung

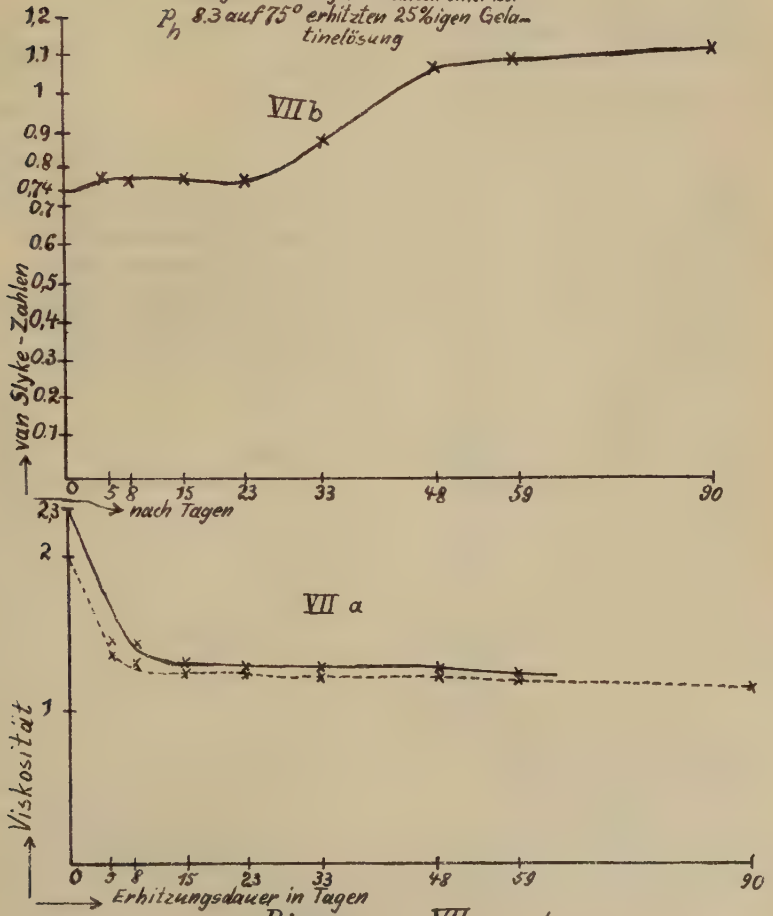
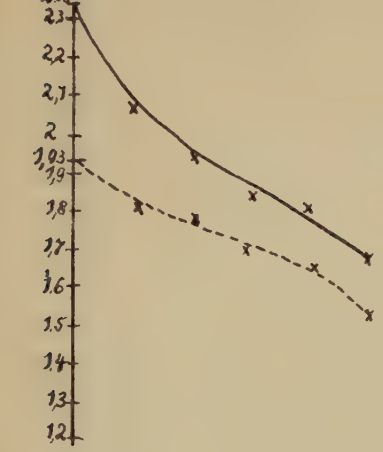


Diagramm VII a u. b.

Viskositätsänderung und Anstieg der van Slyke-Werte einer bei isoelektrischer Reaktion (p_H 5,0) auf 75° erhitzten 25%igen Gelatinelösung



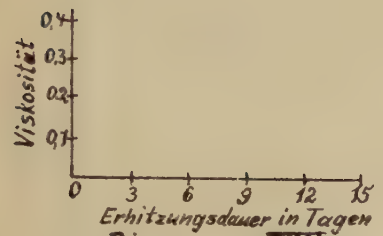


Diagramm VIII

Viskositätsänderung einer bei p_h 4,3 auf 50° erhitzten 25% igen Gelatinelösung.

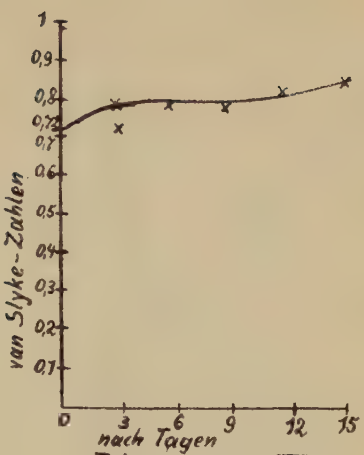


Diagramm IX

Anstieg der van Slyke-Zahlen einer bei p_h 4,3 auf 50° erhitzten 25% igen Gelatinelösung

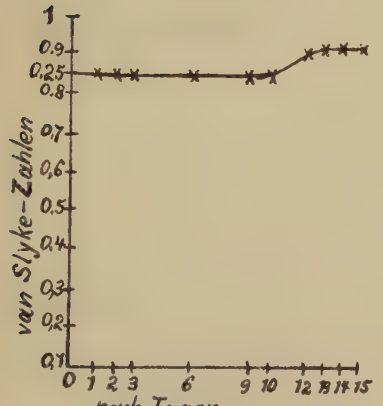


Diagramm X

Anstieg der van Slyke-Zahlen einer bei p_h 6,9 auf 50° erhitzten 9% igen Ovalbuminlösung.

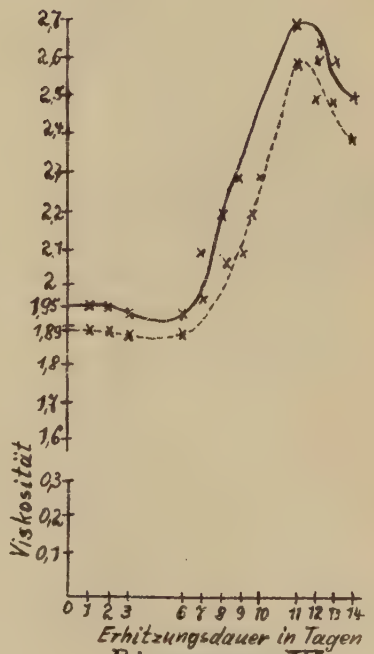


Diagramm XI

Viskositätsänderung einer bei p_h 6,9 auf 50° erhitzten 9% igen Ovalbuminlösung

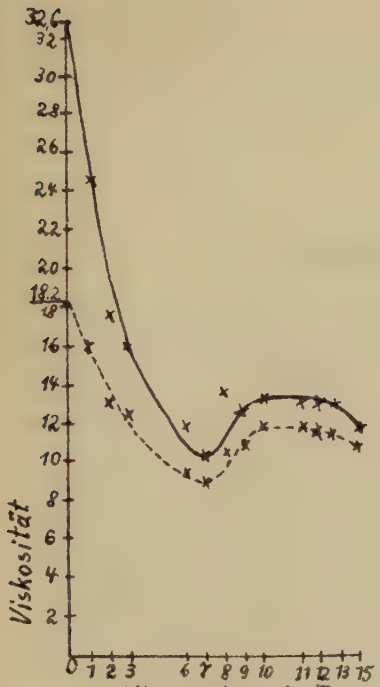


Diagramm XII

Viskositätsänderung einer bei p_h 6,74 auf 60° erhitzten 15%igen Caseinlösung

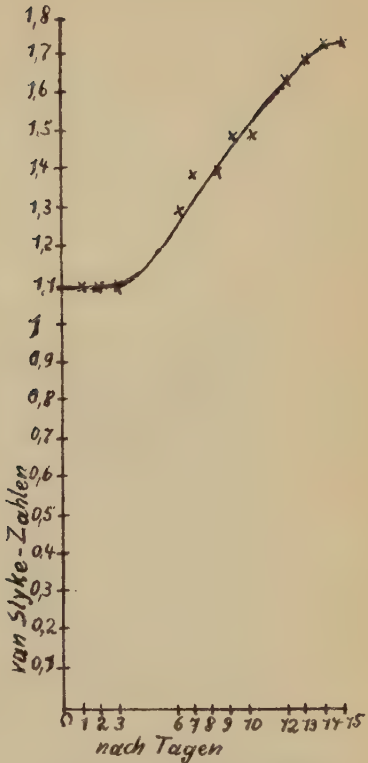


Diagramm XIII

Anstieg der van Slyke-Zahlen einer bei p_h 6,74 auf 60° erhitzten 15% Caseinlösung.

Diagramm XIV

Anstieg der van Slyke-Zahlen einer bei p_h 6,93 und einer bei p_h 5,33 auf 100° erhitzten 0,13n-Lösung von Leucylglycin

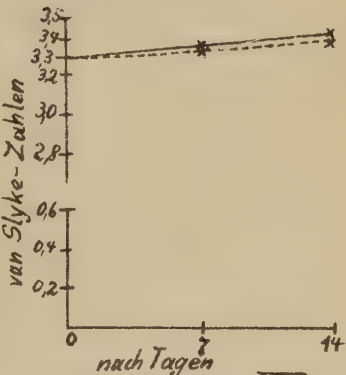


Diagramm XV

Anstieg der van Slyke-Zahlen einer bei p_h 6,85 bezw. 5,39 auf 100° erhitzten n/20 Triglycylglycinlösung.

Lebenslauf.

Ich, Hans Pollak, wurde am 18. Juli 1905 zu Hamburg als Sohn des Kaufmanns Heinrich Pollak und seiner Ehefrau Zella, geb. Hirsch, geboren. Ich besuchte das Schiller-Realgymnasium zu Charlottenburg, welches ich Michaelis 1923 mit dem Zeugnis der Reife verließ. Im Wintersemester 1923/24 ließ ich mich immatrikulieren. Das erste Verbandsexamen legte ich im November 1928 vor Herrn Prof. Marckwald, das zweite Verbandsexamen im Oktober und Dezember 1929 vor den Herren Professoren Rosenheim und Bodenstein ab. Die folgende Zeit meines Studiums war den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen gewidmet, welche in dem von Herrn Prof. Gerngross geleiteten Laboratorium des Technisch-Chemischen Instituts der Technischen Hochschule zu Berlin durchgeführt wurden.

Ich hörte die Vorlesungen bezw. besuchte die Uebungen der folgenden Herren Professoren und Dozenten: Blasius, Bodenstein, Dessoir, Diels, Eggert, Engler, Friedenthal, Gerngross, Gilg, Graebner, Grossmann, Paula Hertwig, Kolkwitz, Löwner, Heinrich Maier, Marckwald, Lise Meitner, Peter Pringsheim, Riesenfeld, Rosenheim, Schlenk, Erhard Schmidt, Ferdinand Jakob Schmidt, Schürhoff, Simonis, Traube, Wehnelt und Westphal.